

1/9/1

DIALOG(R)File 351:Derwent WPI  
(c) 2005 Thomson Derwent. All rts. reserv. 012299965  
WPI Acc No: 1999-106071/199909 XRAM Acc No: C99-031775

**Use of scissile link-containing probes in a cyclic probe technology reaction - used to detect specific target nucleic acid, especially for detecting vancomycin resistant enterococci**

Patent Assignee: ID BIOMEDICAL CORP (IDBI-N)  
Inventor: MODRUSAN Z D  
Number of Countries: 083 Number of Patents: 006

**Patent Family:**

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
WO 9901571	A2	19990114	WO 98CA632	A	19980703	199909 B
AU 9883273	A	19990125	AU 9883273	A	19980703	199923
EP 996743	A2	20000503	EP 98933389	A	19980703	200026
			WO 98CA632	A	19980703	
US 6274316	B1	20010814	US 9751699	P	19970703	200148
			US 9886022	P	19980518	
			US 9890275	P	19980622	
			US 98110048	A	19980702	
JP 2002507129	W	20020305	WO 98CA632	A	19980703	200220
			JP 99506008	A	19980703	
MX 2000000200	A1	20010601	MX 2000200	A	20000103	200235

Priority Applications (No Type Date): US 9890275 P 19980622; US 9751699 P 19970703; US 9886022 P 19980518; US 98110048 A 19980702

**Patent Details:**

Patent No Kind Lan Pg Main IPC Filing Notes

WO 9901571 A2 E 58 C12Q-001/68

Designated States (National): AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY CA CH CN CU CZ DE DK EE ES FI GB GE GH GM GW HU ID IL IS JP KE KG KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MD MG MK MN MW MX NO NZ PL PT RO RU SD SE SG SI SK SL TJ TM TR TT UA UG US UZ VN YU ZW

Designated States (Regional): AT BE CH CY DE DK EA ES FI FR GB GH GM GR IE IT KE LS LU MC MW NL OA PT SD SE SZ UG ZW

AU 9883273 A C12Q-001/68 Based on patent WO 9901571

EP 996743 A2 E C12Q-001/68 Based on patent WO 9901571

Designated States (Regional): AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU MC NL PT SE

US 6274316 B1 C12Q-001/68 Provisional application US 9751699

Provisional application US 9886022

Provisional application US 9890275

JP 2002507129 W 67 C12Q-001/68 Based on patent WO 9901571

MX 2000000200 A1 C12Q-001/68

**Abstract (Basic): WO 9901571 A**

A method of determining the presence of a vancomycin resistance gene in a biological sample comprises reacting target single stranded DNA, exposed from treated cells, with a scissile link-containing nucleic acid probe which is complementary to a portion of the vancomycin resistance gene, and with an enzyme, under conditions so that double stranded DNA is formed by hybridisation of the target and probe nucleic acids. The enzyme can then cleave the scissile link to release one or more fragments of the probe, which is then followed by determining the presence of cleaved probe fragments to detect vancomycin resistance genes. Kits containing scissile link-containing probes and enzymes are also claimed.

USE - The method allows the detection of vancomycin resistant enterococci.

ADVANTAGE - The detection method comprises detecting a decrease in

the amount of uncleaved probe and a direct determination of the cleaved probe. The gene is selected from the vanA, B, B2, C1, C2, C3 or D and variants. More than one van gene can be detected simultaneously. The probes used for the method depend on the sequences to be detected: for vanA: TTAATAACCC AAAAGGCGGG AGTAGCT for vanB: TACATTCTTA CAAAAAATGC GGGCATC or GAGGAAC GAAATCGGGTGCA for vanB2:]GCCGACAGTC TCCCCGCCA TACTCTCC Alternatively the probes have the sequences: CNCANCCGAC CTCACAGCCC GAAA CCGGAAAAAGG CTNGA where N = base, abasic nucleotide or universal nucleotide.

Dwg.0/7

Title Terms: LINK; CONTAIN; PROBE; CYCLIC; PROBE; TECHNOLOGY; REACT; DETECT  
; SPECIFIC; TARGET; NUCLEIC; ACID; DETECT; VANCOMYCIN; RESISTANCE;  
ENTEROCOCCI

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): C12Q-001/68

International Patent Class (Additional): C07H-021/04; C12N-015/09;

C12P-019/34

File Segment: CPI

Manual Codes (CPI/A-N): B04-E05; B04-F10; B11-C08; B12-K04A4; B12-K04F;

D05-A02; D05-H09; D05-H10; D05-H12D1

Chemical Fragment Codes (M1):

\*01\* M423 M750 M903 N102 Q233 V500 V540

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2002-507129

(P2002-507129A)

(43) 公表日 平成14年3月5日 (2002.3.5)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード* (参考)
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 67 頁)

(21) 出願番号 特願平11-506008  
 (86) (22) 出願日 平成10年7月3日 (1998.7.3)  
 (85) 翻訳文提出日 平成11年12月28日 (1999.12.28)  
 (86) 国際出願番号 P C T / C A 9 8 / 0 0 6 3 2  
 (87) 国際公開番号 W O 9 9 / 0 1 5 7 1  
 (87) 国際公開日 平成11年1月14日 (1999.1.14)  
 (31) 優先権主張番号 6 0 / 0 5 1 , 6 9 9  
 (32) 優先日 平成9年7月3日 (1997.7.3)  
 (33) 優先権主張国 米国 (U S)  
 (31) 優先権主張番号 6 0 / 0 8 6 , 0 2 2  
 (32) 優先日 平成10年5月18日 (1998.5.18)  
 (33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 アイディー バイオメディカル コーポレイション  
 カナダ国 ブイ5シー 2ブイ6 プリティッシュ コロンビア, パンクーパー, ウエスト ベンダー 1510-800  
 (72) 発明者 モドゥラサン, ソラ ディー.  
 カナダ国 ブイ6エイチ 1ケイ7 プリティッシュ コロンビア, パンクーパー, ナンバー 208, ウエスト 11ディーエイチ アベニュー 1345  
 (74) 代理人 弁理士 大塩 竹志

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 サイクリングプローブ反応によるバンコマイシン耐性腸球菌を検出するための組成物および方法

## (57) 【要約】

生物学的サンプルにおける腸球菌のバンコマイシン抗生物質耐性遺伝子の存在を決定するための方法であって、(a)生物学的サンプル内に含まれる細胞を処理して、一本鎖-標的核酸分子を露出する工程；(b)この標的一本鎖細胞性核酸を、抗生物質バンコマイシン耐性遺伝子の部分に相補的なプローブ核酸配列および切断されやすい (scissile) 結合を有するプローブ、ならびに酵素分子と、標的およびプローブが互いにハイブリダイズして2本鎖の標的-プローブ複合体を形成し得る条件下で反応させる工程であって、この酵素分子は、1つ以上の核酸プローブのフラグメントが上記の複合体から放出されるように標的-プローブ複合体の切断されやすい結合を切断し得る、工程、および(c)核酸プローブの切断された部分が生成されたか否かを決定する工程であって、それによって、バンコマイシン抗生物質耐性遺伝子の存在を検出する工程、を包含する方法。

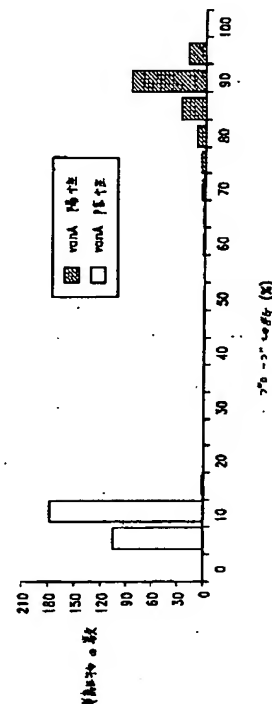


Fig. 2

## 【特許請求の範囲】

1. 生物学的サンプル中の腸球菌のバンコマイシン抗生物質耐性遺伝子の存在を検出するための方法であって、以下の工程：

(a) 該生物学的サンプル内に含まれる細胞を処理して、一本鎖標的核酸分子を露出させる工程；

(b) 該標的一本鎖細胞性核酸を、該抗生物質バンコマイシン耐性遺伝子の一部に相補的な切断されやすい結合を含む核酸プローブおよび酵素分子と、標的およびプローブが互いにハイブリダイズして1つ以上の二本鎖標的プローブ複合体を形成し得る条件下で、反応させる工程であって、該酵素分子が、該標的プローブ複合体の該切断されやすい結合を切断し得、その結果、該核酸プローブの1つ以上のフラグメントが、該複合体から放出される、工程；および

(c) 該核酸プローブの切断部分が産生されるかどうか決定し、それにより、バンコマイシン抗生物質耐性遺伝子の存在を検出する工程、を包含する、方法。

2. 前記検出工程が、非切断プローブの量の減少を検出する工程を包含する、請求項1に記載の方法。

3. 前記検出工程が、前記核酸プローブの切断部分を直接決定する工程を包含する、請求項1に記載の方法。

4. 前記遺伝子が、vanA、vanB、vanB2、vanC1、vanC2、vanC3、vanD、およびそれらの改変体からなる群より選択される、請求項1に記載の方法。

5. 1より多いバンコマイシン抗生物質耐性遺伝子が同時に検出される、請求項1に記載の方法。

6. 前記遺伝子がvanAである、請求項4に記載の方法。

7. 前記プローブが、ヌクレオチド配列TTAATAACCC aaaaGGCGGG AGTAGCT (配列番号1)を含む、請求項5に記載の方法。

8. 前記遺伝子がvanBである、請求項4に記載の方法。

9. 前記プローブが、ヌクレオチド配列TACATTCTTA CaaaaAATGC GGGCATC (配列番号3)を含む、請求項8に記載の方法。

10. 前記プローブが、ヌクレオチド配列GAGGAACgaaaTCGGGTCCA (配列番号7)を含む、請求項8に記載の方法。
11. 前記遺伝子がvanB2である、請求項4に記載の方法。
12. 前記プローブが、ヌクレオチド配列GCCGACAGTC TccccGCCA TACTCTCC (配列番号9)を含む、請求項11に記載の方法。
13. 前記生物学的サンプルが、血液、尿、糞便、および膿瘍からなる群から選択される、請求項1に記載の方法。
14. 前記生物学的サンプルが、細菌学的増殖培地で最初に増殖される、請求項1に記載の方法。
15. 前記遺伝子が、vanA、vanB、およびvanB2からなる群より選択される、請求項1に記載の方法。
16. 前記プローブが、ヌクレオチド配列5'-CN<sup>1</sup>CAN<sup>2</sup>CGACCTCacagCCGAAA-3' (配列番号17)を含み、ここでN<sup>1</sup>およびN<sup>2</sup>は塩基、無塩基ヌクレオチド、または汎用ヌクレオチドであり得る、請求項15に記載の方法。

17. 前記プローブが、ヌクレオチド配列5'-CCGgaaaaAGGCTCN3GA-3' (配列番号16)を含み、ここでN<sup>3</sup>は塩基、無塩基ヌクレオチド、または汎用ヌクレオチドであり得る、請求項15に記載の方法。
18. 生物学的サンプル中のバンコマイシン耐性遺伝子の存在を検出するためのキットであって、(a)バンコマイシン耐性遺伝子に結合した、1つ以上のきれやすい結合を含む核酸プローブ、および(b)該プローブが該標的に結合される場合に、該切断されやすい結合を切断し得る酵素、を含むキット。
19. 前記遺伝子が、vanA、vanB、vanB2、vanC1、vanC2、vanC3、vanD、およびそれらの改変体からなる群より選択される、請求項18に記載のキット。
20. 1つより多いバンコマイシン抗生物質耐性遺伝子が同時に検出される、請求項18に記載のキット。
21. 前記酵素がRNaseHである、請求項18に記載のキット。

## 【発明の詳細な説明】

サイクリングプローブ反応によるバンコマイシン耐性腸球菌を検出するための組成物および方法

## 技術分野

本発明は、一般的に、標的核酸分子を検出するためのプローブ配列および方法に関し、より詳細には、抗生物質バンコマイシン耐性腸球菌（「VRE」）を検出するためのプローブおよびその方法に関する。

## 発明の背景

バンコマイシン耐性腸球菌（VRE）は、世界中の保健医療について深刻な問題を提示する。例えば、疫病管理予防センター（CDC）は、病院が引き起こす感染に関連する抗生物質耐性についてのデータ（この期間の間の抗生物質バンコマイシンに耐性であった腸球菌の割合において20倍の増加を示す（MMWR 42:597-599, 1993））を、1989年1月から1993年3月まで発表した。腸球菌のvanAおよびvanB遺伝子の両方は、増加した耐性に関連することが見出されている。

vanAおよびvanB抗生物質耐性遺伝子の非腸球菌種への移入もまた、増大する関心である。vanA遺伝子は、*Corynebacterium*、*Arcanobacterium*および*Lactococcus* 8種に見出されている（Powerら、*J. Antimicrobiol. Chemother.* 36:595-606, 1995）。近年、Poyartら（*Antimicrobiol. Agents Chemother.* 41:24-29, 1997）は、*Streptococcus bovis*臨床単離物のVarB耐性表現型を伴う出現を報告した。この遺伝子は、*Enterococcus*由来の原型vanB遺伝子に対して高度に相同性であることが示された。

抗生物質の使用の増加は、*Enterococcus* spp. および*Staphylococcus* spp. のようなバンコマイシン耐性微生物の出現を生じた（Dutka-Malenら、*Antimicrobiol. Agents Chemother.* 34:1875-1879, 1990）。バンコマイシン耐性*S. aureus*（VISA）は、高い割合のメチシリン耐性*Staphylococcus aureus*（MRSA）およびバンコマイシンの使用を伴う院内において必ず現れる（Edmondら、*Ann. Intern. Med.* 124:3

29-334, 1996）。近年、VISA単離物は、ラテンアメリカで報告された（Navarro M

arin, International Journal of Antimicrobial Agents 7:293-294, 1996)。

簡単には、グリコペプチド（バンコマイシンおよびテイコブラニン（teicoplanin））の構成性および誘導性耐性の発現に基づいて分離され得る腸球菌の4つの表現型が存在する（LeclercqおよびCourvalin, Clin. Infect. Dis. 24:545-556, 1997）。高レベルのバンコマイシン（MIC $\geq$ 64mg/l）およびテイコブラニン（MIC $\geq$ 16mg/l）に対する誘導性耐性は、VanA表現型の特徴である。この型の耐性は、プラスミドに媒介される。vanA遺伝子は、近年、1つのEnterococcus株の染色体から別のものへのそれ自身の移入を指向し得る移動性エレメントにおいて見出されている。VanB表現型は、4 mg/lから $\geq$ 1,000mg/lのMICを伴うバンコマイシンに対する誘導性耐性として記載されるが、テイコブラニンに対する感受性を提示する。vanB遺伝子は、特定の株における結合体によって移入可能である。VanC表現型における遺伝子は、構成性耐性を産生し、そしてE. gallinarumおよびE. casseliflavusおよびE. flavescensにおいて生じる（LeclercqおよびCourvalin、前出；NavarroおよびCourvalin, Antimicrobiol. Agents Chemother. 38:1788-1793, 1994）。近年、VanD表現型が報告されており、そしてバンコマイシン耐性のレベルおよびテイコブラニンに対する低レベルの耐性を調節することによって特徴付けられる（LeclercqおよびCourvalin、前出に引用される）

グリコペプチド耐性腸球菌の検出のための従来の方法の大部分は、検出の時間、特異性および感受性の欠如に関する欠点を有する。例えばグリコペプチド耐性腸球菌の検出は、従来の感受性試験（ブロスおよび寒天法）によって行われ得るが、これらの技術は遅く、そして自動化検出は、乏しい性能に起因して推奨されない（Aarestrupら、Antimicrob. Agents Chemother. 40:1938-1940, 1996）。

上記の方法を使用してVREを検出し得るが、院内外の両方の設置においてVRE由来のvanA遺伝子およびvanB遺伝子を検出するための、迅速で、使いやすく、かつ信頼できる方法の差し迫った必要性が存在する。本発明は、vanAおよびvanB遺伝子を迅速に検出するためのプローブおよび方法を提供する。さらに、本発明は、他の関連する利点を提供する。

発明の要旨

簡潔に述べると、本発明は、腸球菌由来のvanAおよびvanB遺伝子を検出するための組成物および方法を提供する。

本発明の1つの局面において、生物学的サンプルにおける腸球菌のバンコマイシン抗生物質耐性遺伝子の存在を決定するための方法が提供され、これには以下の工程が含まれる：(a)生物学的サンプル内に含まれる細胞を処理して、1本鎖-標的核酸分子を露出する工程、(b)この標的1本鎖細胞性核酸と、抗生物質バンコマイシン耐性遺伝子の1つ以上の部分に相補的である、1つ以上の切断されやすい(scissile)結合を含む核酸プローブおよび酵素分子を、標的およびプローブが、互いにハイブリダイズし、1つ以上の2本鎖の標的-プローブ複合体を形成させる条件下で反応させる工程であって、この酵素分子は、1つ以上の核酸プローブのフラグメントが上記の複合体から放出されるように標的-プローブ複合体の切断されやすい結合を切断し得る、工程、および(c)核酸プローブの切断された部分が生成されるか否かを決定する工程であって、それによって、バンコマイシン抗生物質耐性遺伝子の存在を検出する工程。種々の実施態様において、切断されたプローブが産生されるか否かの決定は、核酸プローブの切断された部分を直接検出するかおよび/または切断されなかったプローブの量における減少を検出することによって達成され得る。

種々の実施態様において、切断されやすい結合を含む核酸プローブは、vanA、vanB、vanB2、vanC1、vanC2、vanC3、vanD、またはそれらの改変体からなる群より選択されるバンコマイシン耐性遺伝子に相補的である。さらなる実施態様において、1つより多いプローブは、反応あたり1つより多い遺伝子を多重化または検出するために利用され得る。適切なプローブの代表的な例は、以下を含む：

TTAATAACCC aaaaGGCGGG AGTAGCT ( 配列番号1 );  
TACATTCTTA CaaaaAATGC GGGCATC ( 配列番号3 ); GAGGAACgaa  
aTCGGGTGCA ( 配列番号7 ); aaaaGCCGACAGTC TccccGCCA TACTCTCC  
( 配列番号9 )。

さらなる実施態様において、単一のプローブは、反応あたり複数の遺伝子（例えば、vanA、vanB、またはvanB2いずれか1つ）を検出するために利用され得る。



適切なプローブの代表的な例は、 $CN^1CAN^2CCGACCTCacagCCCGAAA$  (配列番号17) およびその修飾体を含み、ここで $N^1$ および $N^2$ は、*vanA*、*vanB*、および*vanB2*に特有の塩基、無塩基部位、または汎用 (universal) 塩基の組み合わせであり得る。

本発明のほかの関連する局面において、生物学的サンプル中のバンコマイシン抗生物質耐性遺伝子の存在を検出するためのプローブが提供され、ここで、このプローブは、バンコマイシン耐性遺伝子の特異的に認識する配列 (例えば、配列番号1、3、9、または17) の少なくとも一部を含む。切断されやすい結合を切断する酵素 (例えば、RNaseH) とともにこのようなプローブを含むキットもまた提供される。

本発明によって、生物学的サンプルにおけるバンコマイシン耐性遺伝子の存在を検出するためのキットもまた提供され、これは、以下を含む: (a) バンコマイシン耐性遺伝子に結合する1つ以上の切断されやすい結合を含む核酸プローブ、および(b) プローブが標的に結合される場合、切断されやすい結合を切断し得る酵素。さらなる実施態様において、遺伝子は、*vanA*、*vanB*、*vanB2*、*vanC1*、*vanC2*、*vanC3*、*vanD*、またはそれらの改変体からなる群より選択される。関連する実施態様において、1つより多いバンコマイシン抗生物質耐性遺伝子は同時に検出される。さらなる実施態様において、この酵素は、RNase Hである。

本発明のこれらのおよび他の局面は、以下の詳細な説明および添付の図面を参照する際に明らかになる。さらに、特定の手順または組成物 (例えば、プラスミドなど) をより詳細に記載する種々の参考文献が、本明細書中に示され、従って、これらの全体が参考として援用される。

#### 図面の簡単な説明

図1は、サイクリングプローブ反応の1つの代表的な実施態様の模式図である。

図2は、CPT反応を使用して、粗溶解物からの*vanA*遺伝子について、440の腸球菌単離物をスクリーニングした結果の度数分布を示すヒストグラムである。 $^{32}P$ 標識したキメラプローブは、*vanA811L-27* (配列番号1) であり、反応混合物は、0.75mMスベルミンおよび1.0mMエチレンビス(オキシエチレントリロ)-四酢酸(EGTA)の組み合わせを含んだ。この単離物は、プローブ切断 (%) に基づいて、*vanA*

陽

性またはvanA陰性腸球菌に対応する2つの手段に容易に分けられ得る。

図3は、CPT反応を使用して、粗溶解物からのvanB遺伝子について、440の腸球菌単離物をスクリーニングした結果の度数分布を示すヒストグラムである。<sup>32</sup>P標識したキメラプローブは、vanB467-27(配列番号3)であり、反応混合物は、1.0mMスperminおよび1.0mM EGTAの組み合わせを含んだ。この単離物は、プローブ切断(%)に基づいて、vanB陽性またはvanB陰性腸球菌に対応する2つの手段に容易に分けられ得る。

図4は、多重化サイクリングプローブ反応によるVREにおけるvanAまたはvanB遺伝子の検出のためのvanAおよびvanBキメラプローブ(配列番号2および7)の同時使用を試験する実験から得られたゲル電気泳動の結果を示す。

図5は、非アイソトープサイクリングプローブ反応の1つの実施態様の模式図である。簡単には、1本鎖標的(I)は、CPTの触媒として作用する。フルオレセイン化(fluoresceinated)(F)およびビオチン化(B) DNA-RNA-DNAキメラプローブ(F-DNA-RNA-DNA-B)(II)およびRNase H(III)の存在下で、プローブ-標的複合体(IV)のRNA部分は、RNase Hによって切断される。より短い切断されたプローブフラグメントが標的から分離され、これによって、さらなるサイクリング工程(V)のための標的DNAが再生される。西洋ワサビペルオキシダーゼとカップリングされた抗フルオレセイン抗体(抗-F-HRP)が添加されて(VI)、反応物は、ストレプトアビジンでコートしたプレートに移される。抗-F-HRPと結合した非切断のプローブは、プレート(VII)を使用して捕捉される。過剰な抗体は洗浄され(VIII)、HRP基質が添加されて(IX)、切断されなかったプローブの量を測定する。吸光度または発色(X)は、標的DNAの量に反比例する。

図6は、非アイソトープCPTアッセイにおける、キメラプローブvanA812L-25(配列番号12)を使用する粗溶解物からのvanA遺伝子について、440の腸球菌単離物のスクリーニングの度数分布結果を示すヒストグラムである。単離物は、650nmでの光学密度(OD<sub>650</sub>)に基づいて、vanA陽性およびvanA陰性腸球菌に対応する2つの集団に容易に分割され得る。

図7は、非アイソトープCPTアッセイにおける、キメラプローブvanB467-27（配列番号3）を使用する粗溶解物からのvarB遺伝子について、440の腸球菌単

離物のスクリーニングの度数分布結果を示すヒストグラムである。単離物は、OD<sub>650</sub>に基づいて、vanB陽性およびvanA陰性腸球菌に対応する2つの集団に容易に分割され得る。

発明の詳細な説明

#### 定義

「核酸分子」とは、重合体のヌクレオチドまたはポリヌクレオチドをいい、これは、天然起源または合成起源のいずれかであり得る。核酸分子の代表的な例としては、DNA(ds-DNAまたはss-DNA)、RNA、DNA-RNAハイブリッド、もしくは核酸アナログ(例えば、天然に存在するヌクレオチドの $\alpha$ -エナンチオマー形態)から構成されるか、またはそれを含む核酸分子が挙げられる。さらに、ヌクレオチドは、それらの糖部分、またはピリミジン塩基もしくはプリン塩基部分において改変され得る。糖部分に対する改変の例としては、例えば、1つ以上のヒドロキシル基の別の基での改変または置換が挙げられる。塩基部分に対する改変としては、アルキルまたはアシル化のピリミジンおよびプリンが挙げられる。さらに、核酸単量体が、ホスホジエステル結合、またはこのような結合のアナログ(例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホルアミダイトなど)によって結合され得る。

「単離された核酸分子」とは、生物のゲノムDNAに組み込まれない核酸分子をいう。単離された核酸分子としては、例えば、プローブおよび合成的または組換え的に生成された他の核酸分子が挙げられる。

「切断されやすい結合」とは、分子自体または標的核酸配列の核酸配列を全く切断または破壊することなく、切断または破壊され得る核酸分子をいう。切断されやすい結合としては、2つの核酸配列を結合し、かつ結合される核酸配列を切断することなく選択的に切断され得る、任意の結合させる化学構造が挙げられる。切断されやすい結合は、単結合または複数単位配列であり得る。このような化学構造の例は、RNA配列である。他の切断されやすい結合として適切な化学構造

は、DNA配列、アミノ酸配列、無塩基性ヌクレオチド配列、もしくは無塩基性ヌクレオチド、または任意の炭水化物ポリマー(すなわち、セルロースまたはデンプン)

である。切断されやすい結合が核酸配列である場合、これは、(下記に記載される)NA<sub>1</sub>およびNA<sub>2</sub>の核酸配列とは異なる。

「切断されやすい結合を含むプローブ」とは、標的核酸分子に相補的または実質的に相補的である公知の配列を考慮して構築される合成核酸分子をいう。特定の実施態様において、プローブは、構造「NA<sub>1</sub>--S--NA<sub>2</sub>」<sub>n</sub>を含み、ここで、NA<sub>1</sub>およびNA<sub>2</sub>は、異なる非相補的な核酸分子であり、Sは、切断されやすい結合であり、そしてnは、1~10の整数である。

「リボヌクレアーゼH」(「RNase H」)とは、RNA:DNAのハイブリッド二重鎖におけるRNA鎖を特異的に切断し得る酵素をいう(一般的には、CrouchおよびDirksen in Nucleases, LinnおよびRoberts編、211-241頁、Cold Spring Harbour Laboratory Press, Plainview, NY, 1982を参照のこと)。

「汎用塩基」とは、二重鎖における天然の塩基であるアデニン、グアニン、シトシン、およびチミンの各々に対形成し得る塩基、あるいは二重鎖における反対の塩基に対形成し得ないが不安定化しない塩基をいう。汎用塩基のいくつかの例は、イノシン、インドール、5-ニトロインドール、3-ニトロピロール、および5-ニトロピロールである。キメラオリゴヌクレオチドプローブは、1つ以上の標的配列のミスマッチに適合する適切な位置で、1つ以上の標的塩基を含むように合成され得る。

「無塩基ヌクレオチド」または「無塩基部位」とは、塩基部分を含まないデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドをいう。キメラオリゴヌクレオチドプローブは、1つ以上の標的配列のミスマッチに適合する適切な位置で、無塩基部位を含むように合成され得る。

上記のように、本発明は、生物学的サンプルにおける腸球菌のバンコマイシン耐性遺伝子の存在を決定するための方法を提供し、これは、以下の工程を包含する: (a) 生物学的サンプル内に含まれる細胞を処理して、1本鎖標的核酸分子を

露出する工程、(b)標的1本鎖細胞性核酸と、抗生物質バンコマイシン耐性遺伝子の一部に相補的である、切断されやすい結合を含む核酸プローブと、酵素分子とを、標的およびプローブが、2本鎖の標的-プローブ複合体を形成させるように互いにハイブリダイズすることを可能にさせる条件下で反応させる工程であつ

て、この酵素分子は、1つ以上の核酸プローブのフラグメントが上記の複合体から放出されるように標的-プローブ複合体の切断されやすい結合を切断し得る、工程、および(c)核酸プローブの切断された部分が生成されるか否かを決定する工程であつて、それによって、バンコマイシン抗生物質耐性遺伝子の存在を検出する工程。

このような方法を利用して、広範な種々の生物学的サンプル内に所望の標的核酸分子の存在を検出し得る。生物学的サンプルの代表的な例としては、臨床サンプル(例えば、血液、尿、糞便、または膿瘍)ならびに細菌学的増殖培地上で増殖および/または単離された臨床的サンプルが挙げられる。標的核酸分子を生成するための方法は、本明細書中に提供される開示によって、当業者により容易に達成され得る(一般的に、Sambrookら., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第2版)、Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989を参照のこと)。

上記のように、本発明の1つの局面内で、標的核酸分子は、切断されやすい結合を有する、相補的な一本鎖核酸プローブと反応される。簡単に言うと、切断されやすい結合を有する広範な種々の核酸プローブは、本発明の文脈内で利用され得る。好ましくは、このプローブは、酵素(これは、切断されやすい結合でプローブ-標的複合体を特異的に切断し得る)による切断の際に、プローブ部分が検出可能に放出されるように設計される(米国特許第4,876,187号、同第5,011,769号および同第5,403,711号を参照のこと)。本発明の好ましいプローブ分子は、一般に  $[(NA_1)_x(-S)_z(-NA_2)_y]_n$  構造を有する。ここで  $NA_1$  および  $NA_2$  は、核酸または核酸アナログから構成される分子であり、 $-S-$  は切断されやすい結合であり、そして  $x$ 、 $y$  および  $z$  は、1~100の整数であり、そして  $n$  は、1~10の整数である。本発明の特定の特に好ましい実施態様内で、 $NA_1$  および  $NA_2$  は、3から40ヌクレオチドの範囲であり得る。そして  $S$  が核酸から構成される場合、 $NA_1$  および

NA<sub>2</sub>は、2から20ヌクレオチドのサイズの範囲であり得る。さらに、本発明の文脈内で利用されるように、各々のx、yおよびzは、nの各反復によって変わり得ることが理解されるべきである。本発明の種々の実施態様内で、一本鎖プローブが使用され、一本鎖標的配列と反応するかあるいはハイブリダイズするが、上記に記載される方法は、相補的プローブおよび標的配列とのペアが、二重鎖を形成する

ような状況のみに限定されないべきである。

1つの実施態様内で、上記に記載されるようなNA<sub>1</sub>およびNA<sub>2</sub>は、DNA分子であり、同じ配列を有してもよいし、有さなくともよい。あるいは、NA<sub>1</sub>およびNA<sub>2</sub>は、RNA分子（これは、同じ配列を有してもよいし、有さなくともよい）またはRNAおよびDNA分子の組合わせから構築され得る。利用されるDNA分子またはRNA分子は、天然に存在する供給源から誘導され得るか、あるいはこれらは、合成的に形成され得る。各々のNA<sub>1</sub>およびNA<sub>2</sub>は、約5塩基〜10,000塩基長であり得る。

他の実施態様内で、NA<sub>1</sub>またはNA<sub>2</sub>は、メチルホスホネート、カルバメート、アミデート、トリエステル、または「ペプチド核酸」（「PNA」）のような、核酸アナログから構成され得る。例えば、PNAオリゴマーは、非常に高い特異性で相補的な標的オリゴヌクレオチド(DNAまたはRNA)配列とハイブリダイズし得る。このような二本鎖は、対応するDNA-DNAまたはDNA-RNA二本鎖よりも安定である(Egholmら、Nature 365:556-568, 1993)。さらにPNAは、鎖置換によって二本鎖(ds)DNAに結合し得(Nielsenら、Science 254:1497-1500, 1991)、それゆえサンプル調製において、慣用的な二本鎖変性の必要性を除き得る。低濃度の塩(50mM/L以下のNa<sup>+</sup>)が、一般的にdsDNAへのPNAの結合のために好ましい。中程度の濃度の塩は、dsDNAへのPNAの二本鎖置換を通して結合を阻止し得る。しかし、一旦結合したPNA/DNA二重鎖は、高濃度の塩に対して安定である。さらにこれらの二重鎖はまた、オリゴヌクレオチド/オリゴヌクレオチド二重鎖と比べて熱的に安定である(PNA/DNAの二重鎖は、対応するDNA/DNAと比較して、塩基対あたり約1°Cほど、より安定である)。標的オリゴヌクレオチドに対する高度な配列特異性、一旦形成した二重鎖の高塩濃度に対するより高い熱安定性および耐性の必要性に基づ

くと、PNAは、しばしば本明細書に記載される方法における使用のための理想分子である。特定の実施態様内で、2つの短いPNAが、切断されやすい結合と共に連結され得、そして高度な配列特異的プローブとして使用され得る。

一本鎖核酸分子は、標準的な技術（例えば、Sambrookら、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」, Cold Spring Harbor, 1989を参照のこと）を使用して標的細胞または生物から直接得られるかおよび/または調製され得るか、あるいは広範な種々の技術（例えば、PCR、NASBA、RNAの逆転写、SDA、分枝鎖DNA

などを含む）のいずれかを利用して調製され得る。

本発明のプローブはまた、一方の末端または両末端（例えば、NA<sub>1</sub>またはNA<sub>2</sub>）に付加される1つ以上の検出可能なマーカーを有し得る。マーカーは、検出され得る実質的に任意の分子または試薬（これらの代表的な例は、放射性同位体または放射標識された分子、蛍光分子、蛍光抗体、酵素または化学発光触媒を含む）であり得る。本発明の特定の実施態様内で、プローブは、蛍光標識または酵素的標識（例えば、消光された蛍光対、または蛍光標識および酵素標識）、またはビオチンのような標識および結合分子（例えば、切断されるかあるいは切断されない状態のいずれかで、このプローブは標識分子および結合分子の両方に共有結合または非共有結合され得る）のような1つ以上の標識を含み得る（例えば、米国特許第5,731,146号もまた参照のこと）。

特定の改変体内で、プローブおよび標的核酸分子は、好ましくは、相補的である必要はないが、実際、1つ、2つ、3つまたはそれ以上の核酸によって意図的に異なり得る（例えば、PCT公開W095/14106および米国特許第5,660,988号を参照のこと）。さらなる改変体内で、標的核酸分子は、ゲノム核酸の不均質集団中に存在する。

上記に記載されるように、核酸プローブは、切断されやすい結合（これは、分子自身または標的核酸配列の任意の核酸配列を切断または破壊することなく、切断または破壊され得る）を有する。本発明の文脈内で使用されるように、切断されやすい結合は、任意の接続する化学的構造（これは2つの核酸配列を結合し、そして結合される核酸配列を切断することなく選択的に切断され得る）である。

切断されやすい結合は、単一結合または複数単位配列であり得る。このような化学的構造の例は、RNA分子であり得る。切断されやすい結合として適切であり得る他の化学的構造は、DNA分子、アミノ酸配列、無塩基性ヌクレオチド分子または任意の炭水化物ポリマー（例えば、セルロースまたはデンプン）である。切断されやすい結合が核酸分子である場合、これは $NA_1$ および $NA_2$ の核酸配列とは異なるべきである。

上記に記載される核酸プローブにおいて、 $n$ が1よりも大きい場合、単位 $NA_1-S-NA_2$ は繰り返す。本明細書中に提供される開示によって当業者に容易に理解さ

れるべきであるように、この単位は各繰り返し内で同一であり得るか、または規定されるパターンにおいてランダムに変化し得る。さらに、切断されやすい結合もまた、単位ごとに変化し得る。例えば、1つの切断されやすい結合は、アミノ酸配列であり得、そして別の切断されやすい結合は、RNA分子であり得る。

上記に記載されるように、本発明のプローブはまた、固体支持体へ直接的または、化学的リンカーを介してのいずれかで連結され得る。固体支持体の代表的な例は、シリカ物質、セルロース物質、ポリマーベース物質またはプラスチック物質を含む。

本発明の特定の好ましい実施態様内で、核酸プローブは構造： $[NA_1-S-NA_2]_n$ を有する。ここで、 $NA_1$ および $NA_2$ は核酸配列であり、 $S$ は、切断されやすい核酸連結であり、そして $n$ は1から10の整数である。この実施態様内で、 $NA_1$ と $NA_2$ とは異なる核酸配列（これは、互いに非相補的である）であり、そして $-S-$ は、切断されやすい結合（これは、 $NA_1$ もしくは $NA_2$ 、または $NA_1$ もしくは $NA_2$ 配列にハイブリダイズし得る標的核酸配列を切断または破壊することなく、切断されるかまたは破壊され得る）である。ここで切断されやすい結合が核酸配列であるならば、 $NA_1$ および $NA_2$ の両方がDNA配列である場合、これはRNAであり、または $NA_1$ および $NA_2$ の両方がRNA配列である場合、切断されやすい結合はDNAである。

このような核酸プローブを構築するための方法は、本明細書中に提供される所定の開示により、当業者によって容易に達成され得る。

本発明の方法において有用な核酸分子は、加水分解性連結または持続的な（非



加水分解性)連結のいずれかを使用する固体支持媒体物(例えば、シリカゲルまたは制御される細孔ガラス)上で構築され得る。公開されている化学的方法は、この合成のために使用された。オリゴヌクレオチド分子は、MatteucciおよびCaruthers, J. Am. Chem. Soc. 103:3185, 1981;BeaucageおよびCaruthers, Tetrahedron Lett. 22:1859, 1981;Alvarado-Urbinaら、「Automated Synthesis of Gene Fragments」Science 214:270-274, 1981により一般に記載されるように構築される;米国特許第4,876,187号、同第5,011,769号および同第5,403,711号もまた参照のこと。オリゴヌクレオチドアナログおよび結合体の合成については、一般には、Agrawal (編) Protocols For Oligonucleotides And Analogs, Synthesi

s;Synthesis and Properties, Methods in Molecular Biology第20巻、Humana Press Inc., 1993;Egholmら、Nature 365:566-568, 1993;Dueholmら、J. Org. Chem. 59:5767-5773, 1994;Agrawal (編) Protocols For Oligonucleotide Conjugate, Synthesis And Analytical Techniques, Methods in Molecular Biology第26巻、Humana Press Inc., 1994を参照のこと。非同位体プローブについては、一般には、Kriscka, Non-Isotopic DNA Probe Techniques, Academic Press Inc., New York, 1992を参照のこと。

詳細には、好ましいプローブ(および合成標的物)は、Dutka-Malenら、Mol. Gen. Genet. 224:364-372, 1990(GenBankアクセス番号X56895)、Eversら、Gene 140:97-102, 1994(GenBankアクセス番号U00456)により公開されるvanA、varB、varB2遺伝子に基づき、そしてGenBankアクセス番号Z83305、Goldら(Antimicrobiol. Agents Chemother. 37:1604-1609, 1993)もまた、vanB2配列(GenBankアクセス番号L15304)を公開した。より好ましいプローブは、vanA、varBまたはvarB2遺伝子の任意の1つを検出し得る単一のプローブであり、これは共通配列または修飾(例えば、配列中のミスマッチ位置での無塩基または汎用のヌクレオチドの使用)に基づいており、これによりこれらの遺伝子の検出を可能にする。

簡潔には、オリゴヌクレオチド合成はサイクル中で達成され、ここで各サイクルは、1つのヌクレオチドによりオリゴヌクレオチドを伸長する。各サイクルは、以下の4つの工程から構成される:(1)固体支持体上でのヌクレオチドまた

はオリゴヌクレオチドの5'-末端を脱保護する工程；(2) 次なるヌクレオチドホスホロアミダイト(phosphoroamidite)を固相に固定されたヌクレオチドに結合させる工程；(3) さらなるホスホロアミダイトに結合しない固定されたヌクレオチドの5'-OH基の僅かな割合を増加させる(capping)工程；および(4) ホスホトリエステル連結に対してオリゴヌクレオチド連結物を酸化させる工程。

オリゴヌクレオチドの合成ならびにオリゴヌクレオチドのビオチン化およびオリゴヌクレオチドの蛍光化のための代表的な方法が、実施例1に示される。

任意の腸球菌vanAまたはvanBまたはvanB2遺伝子を同時検出するための単一のキメラ型プローブの設計および合成

vanA遺伝子およびvanB遺伝子の2つの領域が、プローブの設計および合成のために考慮される。領域#1は、vanABrod2-24プローブ(配列番号18；IDB配列番号450、以下を参照のこと)ならびに以下に記載されるような連続および/または修飾に基づく他のプローブの設計および合成をもたらした。領域#2は、4つのプローブであるvanA1117-21(配列番号13；IDB配列番号434)、vanA1121-17(配列番号14；IDB配列番号442)、vanB799-21(配列番号15；IDB配列番号435)およびvanABrod1-17(配列番号16；IDB配列番号443)の設計および合成をもたらした。

$N^1$ および $N^2$ (ミスマッチ)として標識される2つのヌクレオチドの例外を有する領域#1については、以下のオリゴヌクレオチド配列が、vanA、vanBおよびvanB2の遺伝子と重複する：

5'-CN<sup>1</sup>CAN<sup>2</sup>CCGACCTCacagCCCGAAA-3' (配列番号17)

vanA、vanBおよびvanB2の遺伝子および相補的プローブについての配列における差異は、以下に詳述される：

vanA遺伝子については、 $N^1=T$ 、 $N^2=T$ 、次いで、プローブについては、 $N^1=A$ 、 $N^2=A$ ；

vanB遺伝子については、 $N^1=C$ 、 $N^2=C$ 、次いで、プローブについては、 $N^1=G$ 、 $N^2=G$ ；および

vanB2遺伝子については、 $N^1=T$ 、 $N^2=G$ 、次いで、プローブについては、 $N^1=A$ 、 $N^2=C$ 。

上述の基本的プローブ配列(配列番号17)は、全ての上述の遺伝子を同時に検出し得る単一のプローブを設計するために多くの方法で修飾され得、そして以下のものは、幾つかの代表的な修飾例である：

A) vanA、vanBまたはvanB2遺伝子のいずれかの代表的な塩基の組み合わせ

配列番号17において、 $N^1 = A$  (すなわち、vanAおよびvanB2の特色を示す) および  $N^2 = G$  (すなわち、vanBの特色を示す) である場合、得られたプローブは：vanABmod5-23プローブ(配列番号21；IDB配列番号476)。

B) より短い長さのプローブ

以下のものが、より短い長さのプローブの例である：vanABrod3-22(配列番号19；IDB配列番号477)、vanB687-22(配列番号30；IDB配列番号534)、vanABmod

6-21(配列番号22；IDB配列番号494)、vanB687-21(配列番号31；IDB配列番号535)、vanABrod7-20(配列番号23；IDB配列番号493)、vanB687-20(配列番号32；IDB配列番号536)、およびvanABmod8-19(配列番号24；IDB配列番号492)。

C) ミスマッチ位置での化学的に修飾された塩基

以下のプローブが、 $N^1$ および $N^2$ の位置で修飾された：vanABmod2-24(配列番号18；IDB配列番号450)は、無塩基部位として $N^1$ および $N^2$ を有し；vanABmod3-22(配列番号19；IDB配列番号477)、vanABmod6-21(配列番号22；IDB配列番号494)、およびvanABmod7-20(配列番号23；IDB配列番号493)は無塩基部位として $N^2$ を有し；vanABrod4-22(配列番号20；IDB配列番号478)は汎用の塩基であるイノシンとして $N^2$ を有し；vanABmod9-22(配列番号25)およびvanABmod9-20(配列番号26)は3つの塩基の混合として $N^2$ を有し(すなわち、A、G、Cがそれぞれ33%)；ならびにvanABrod10-22(配列番号27)およびvanABrod10-20(配列番号28)は汎用の塩基である5-ニトロインドールとして $N^2$ を有する。

領域#2に基づく配列については、以下の2つのプローブが単一のプローブVREアッセイのために合成された。これらのプローブは、下線により示される1塩基を除いては同様の配列を有する：

vanA1117-21 ( 配列番号 13; IDB 配列番号 434)

CGAGCCGGaaaaAGGCTCTGA

vanB799-21 ( 配列番号 15; IDB 配列番号 435)

CGAGCCGGaaaaAGGCTCAGA

上記のプローブは以下のようにさらに修飾された:

- 1) プローブ長が短縮され、そしてvanA1121-17 (配列番号14; IDB配列番号44
- 2) により示された。
- 2) ミスマッチ位置の無塩基部位として化学的に修飾された塩基であり、そしてvanBmod1-17 (配列番号16; IDB配列番号443) により示された。

#### 検出反応

上記に記載のように、所望される標的核酸分子を検出するためのサイクリング反応は、上記に示される一般的な工程に従って容易に実施され得る (米国特許第

5,011,769号および同第5,403,711号もまた参照のこと)。

他の実施され得るサイクリング反応は、標的核酸分子を、切断されやすい連結を有する相補的な1本鎖の核酸プローブと、プローブを標的核酸分子とハイブリダイズし、そして2本鎖の標的-プローブ複合体を形成することを可能にする条件下で反応させる工程を含む。

本明細書中で提供される組成物および方法は、広範な様々の、他の/関連する方法において利用され得る (例えば、米国特許第5,210,015号; 同第5,487,972号; 同第5,422,253号; 同第5,691,142号; 同第5,719,028号; 同第5,130,238号; 同第5,409,818号; 同第5,554,517号; 同第5,589,332号; 同第5,399,491号; 同第5,480,784号; 同第5,215,899号; 同第5,169,766号; 同第5,194,370号; 同第5,474,916号; 同第5,698,400号; 同第5,656,430号; およびPCT出願番号WO 88/10215:WO 92/08800:WO 96/02668:WO/97/19193:WO 97/09444:WO 96/21144:WO 92/22671)。このアッセイの他のバリエーションは、例えば、米国特許第5,403,711号 (米国特許第5,747,255号もまた参照のこと) に記載されるような「指数関数的な」サイクリング反応を含む。

さらなる適切なアッセイ形式の代表的な例は、上記の任意のアッセイを含み、

これらは、ディップスティック、磁気ビーズなどのような固体支持体上で実施される（一般には、米国特許第5,639,428号；同第5,635,362号；同第5,578,270号；同第5,547,861号；同第5,514,785号；同第5,457,027号、同第5,399,500号；同第5,369,036号；同第5,260,025号；同第5,208,143号；同第5,204,061号；同第5,188,937号、同第5,166,054号；同第5,139,934号；同第5,135,847号；同第5,093,231号；同第5,073,340号；同第4,962,024号；同第4,920,046号；同第4,904,583号；同第4,874,710号；同第4,865,997号；同第4,861,728号；同第4,855,240号；および同第4,847,194号を参照のこと）。

本発明の特定の実施態様の内部において、サイクリングプローブ反応が、感受性、特異性および/または反応速度を増加させるポリアミン（例えば、スperlミン）またはリボソームタンパク質のような添加物を利用して実施され得る。これらおよび他の関連する局面は、「ADDITIVES FOR USE IN CYCLING PROBE REACTIONS」（1998年5月18日出願（代理人整理番号480094.419P2））；および「METHODS

FOR accelerating HYBRIDIZATION OF NUCLEIC ACID MOLECULES」（1992年5月18日出願（代理人整理番号480094.422P2））と題される米国仮出願に記載される。以下の実施例は例示を目的として提供されるものであり、そして制限することを目的とはしない。

#### 実施例

##### 実施例 1

##### 核酸プローブの構築

核酸分子を、自動化固相合成装置（例えば、PerSeptive Biosystems Expedite DNA synthesizer (Boston, MA)、PE Applied Biosystems Inc.'s Model 391 DNA Synthesizer (PCR-MATEEP)またはPE Applied Biosystems, Inc.'s Model 394 DNA/RNA Synthesizer (Foster City, CA)で標準的な化学を利用して合成し得る。好ましくは、PerSeptive Biosystems Expedite DNA Synthesizerを使用し、そして製造者のオリゴヌクレオチド作製のための改変版プロトコルを実施する。

オリゴヌクレオチドの合成についての試薬は、合成装置の製造元（例えば、PerSeptive Biosystems, PE Applied Biosystems Inc., Glen Research (Sterling

, VA) および Biogenex) を含む様々な供給源から市販されている。DNA および RNA 合成については、好ましい蛍光アミダイトデオキシヌクレオチドおよびリボヌクレオチドのホスホラミダイト、2'-O-メチル基および試薬 (例えば、アクチベーター、CapA、CapB<sub>2</sub>、酸化剤、およびトリチル逆ブロッキング試薬、) は、PerSeptive Biosystems より市販されている。ビオチン-TEG-ホスホラアミダイトおよびビオチン-TEG-CPG は、Glen Research より入手可能である。オリゴヌクレオチドの脱保護のために使用される水酸化アンモニウム (28%) は、Aldrich から購入する。2'-O-tert-ブチルジメチルシリル基を除去するために使用する 1M テトラブチルアンモニウムフルオライド (TBAF) を、Aldrich から購入し、そしてモレキュラーシーブに 24 時間通して乾燥させた後に使用する。全ての緩衝液を、

高圧滅菌水から調製し、そして 0.2  $\mu$ m フィルターを介してフィルター濾過する。

以下の手順を、ビオチン化および/または蛍光化オリゴヌクレオチドの調製について使用する。ビオチン-TEG-CPG (1  $\mu$ mol) を、合成カラム中に充填する。次いで、ヌクレオシドホスラミダイトをオリゴヌクレオチド作製についての PerSeptive Biosystems の改変版プロトコルを使用して規定される核酸配列を作製するために連結する。蛍光アミダイトを、0.1M の終濃度までアセトニトリル中に溶解する。蛍光アミダイトを合成装置に充填し、そしてオリゴヌクレオチドの 5'-末端に付加させる。あるいは、チオリンカーを含むホスホラミダイトを修飾版プロトコルを使用してキメラ型プローブの 5'-末端に付加させる。以下に記載される脱保護工程の後、プローブを、Millipore の R-2 樹脂 (これはトリチル含有オリゴヌクレオチドを保持する) を使用する逆相 HPLC により精製する。遊離の反応性チオ基を生成するために、HPLC 精製プローブを、90 分間、室温にて硝酸銀で処理し、次いで硝酸銀をジチオトレイトール (DTT) で中和する。次いで、フルオレセインマレイミドをプローブの遊離のチオ基に付加し、次いで HPLC によるかまたは以下に記載される電気泳動によるかのいずれかで精製する。

オリゴヌクレオチド配列の合成後、樹脂に結合したオリゴヌクレオチドを、最初に 25% エタノール-アンモニウム水酸化物 (4ml) で、室温で 1 時間処理し、引き続いて 55°C で 16 時間、閉栓したチューブ内で処理する。このチューブを冷却し

、上清を除去し、そしてアンモニアを除去するために乾燥濃縮する。この残留物を1mlの水に溶解させ、そして0.2 $\mu$ mのフィルターを通してフィルター濾過する。OD<sub>260</sub>を決定し、そしておよそ20D<sub>260</sub>単位のアリコートをBiocadのHPLCのR-2カラムに注入し、キメラ型プローブのtert-ブチルジメチルシリル基についてのクロマトグラム上のベースラインを得る。

残留プローブ溶液を、1.5mlの微量遠心チューブ中の遠心性吸引蒸発装置 (Labconco) により凍結乾燥させる。得られたオリゴヌクレオチド残留物を、1.0M TBAFで24時間、脱保護する。生じた脱シリル化の程度を決定するために、TBAF反応混合物のアリコートを、50mM酢酸トリエチルアンモニウム (TEAA)、pH6.5での0~60%のアセトニトリルの線形勾配を使用してHPLC(R-2カラム)に注入する。部分的な脱シリル化のみが生じる場合、TBAF反応混合を、さらに12~16時間進行

させて、保護基の完全な除去を行う。TBAF反応混合物を、100mM NaOAc、pH5.5でクエンチし、そして吸引蒸発させて乾燥させる。粗オリゴヌクレオチド産物をP-6カラム (2cm $\times$ 10cm、Bio-Rad) で脱塩し、画分を約1mlまで濃縮し、そしてOD<sub>260</sub>で濃度測定する。

粗オリゴヌクレオチドを、20%ポリアクリルアミド-7M尿素を使用してポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) により精製する。泳動ゲル緩衝液は、1 $\times$ TBE (Tris-ホウ酸塩-エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)、pH8.3) であり、そして電気泳動を、50mAの電流で3.5~4時間で実施する。オリゴヌクレオチドのバンドをUV光で可視化し、切り出して、15mlのプラスチックのコニカルチューブに入れ、そして5mlの50mM NaOAc (pH5.5) で約12時間、ゲルを破碎および浸漬することにより抽出する。次いで、このチューブを3000RPMで遠心分離し、そして上清をパスツールピペットで注意深く除去する。このゲルを2mlの抽出緩衝液でリンスし、いくらかの残留産物を除去する。この組み合わせられた抽出物を約1mlの容量まで濃縮し、そしてP-6カラムで脱塩する。プローブを含む画分をプールし、そして約2mlの最終容量まで濃縮する。オリゴヌクレオチドの分析の純度を、オリゴヌクレオチドの5'末端を[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATPおよびT4-ポリヌクレオチドキナーゼで標識することにより確認し、次いで標識化オリゴヌクレオチドをPAGEで電気泳動する。

OD<sub>260</sub>をHewlett Packardの845×UV分光光度計を使用して測定する。このオリゴヌクレオチド溶液を0.2μmのフィルターを通して濾過し、そして-20°Cで保管する。

上記の手順を利用するために、以下のオリゴマーを合成した(大文字はデオキシリボヌクレオチドを示すために使用され、そして小文字はリボヌクレオチドを示すために使用されている) :

vanA811L-27 プローブ配列 (配列番号 1; IDB 配列番号 143)

5'-TTAATAACCCaaaaGGCGGGAGTAGCT-3'

vanA811L-27T 標的配列 (配列番号 2; IDB 配列番号 144)

5'-AGCTACTCCCGCCTTTTGGGTTATTAA 3'

vanB467-27 プローブ配列 (配列番号 3; IDB 配列番号 294)

5'-TACATTCTTACaaaaAATGCGGGCATC-3'



vanB467-27-T 標的配列 (配列番号 4; IDB 配列番号 295)

5'-GATGCCCCGATTTTTTTGTAAGAATGTA-3'

vanB242-27 プレ-β配列 (配列番号 5; IDB 配列番号 133)

5'-GCCGATAGTCTccccGCCATATTCTCC-3'

vanB242-27T 標的配列 (配列番号 6; IDB 配列番号 137)

5'-GGAGAATATGGCGGGGAGACTATCGGC-3'

vanB857-20 プレ-γ配列 (配列番号 7; IDB 配列番号 292)

5'-GAGGAACgaaaTCGGGTGCA-3'

vanB857-20T 標的配列 (配列番号 8; IDB 配列番号 293)

5'-TGCACCCGATTTCGTTCTCTC-3'

vanB2242-27 プレ-γ配列 (配列番号 9; IDB 配列番号 267)

5'-GCCGACAGTCTccccGCCATACTCTCC-3'

vanB2242-27T 標的配列 (配列番号 10; IDB 配列番号 289)

5'-GGAGAGTATGGCGGGGAGACTGTCGGC-3'

vanA813L-25 プレ-γ配列 (配列番号 11; IDB 配列番号 383)

5'-TTAATAACCCaaaaGGCGGGAGTAG-3'

vanA812L-25 プレ-β配列 (配列番号 12; IDB 配列番号 359, 394)

5'-TAATAACCCaaaaGGCGGGAGTAGC-3'

vanA1117-21 (配列番号 13; IDB 配列番号 434)

5'-CGAGCCCGaaaaAGGCTCTGA-3'

vanA1121-17 (配列番号 14; IDB 配列番号 442)

5'-CCGaaaaAGGCTCTGA-3'

vanB799-21 (配列番号 15; IDB 配列番号 435)

5'-CGAGCCCGaaaaAGGCTCAGA-3'

vanABmod1-17 (配列番号 16; IDB 配列番号 443)

5'-CCGGAaaaAGGCTCN<sup>3</sup>GA-3'

ここで N<sup>3</sup> は無塩基ヌクレオチドである

配列番号 17

5'-CN<sup>1</sup>CAN<sup>2</sup>CCGACCTCacagCCCGAAA-3'

ここで N<sup>1</sup> および N<sup>2</sup> は無塩基ヌクレオチド、一般的なヌクレオチド、または天然のヌクレオチドの混合物である。

vanABmod2-24 (配列番号 18; IDB 配列番号 450)

5'-CN<sup>1</sup>CAN<sup>2</sup>CCGACCTCacagCCCGAAA-3'

ここで N<sup>1</sup> および N<sup>2</sup> は無塩基である

vanABmod3-22 (配列番号 19; IDB 配列番号 477)

5'-CAN<sup>2</sup>CCGACCTCacagCCCGAAA-3'

ここで N<sup>2</sup> は無塩基である

vanABmod4-22 (配列番号 20; IDB 配列番号 478)

5'-CAN<sup>2</sup>CCGACCTCacagCCCGAAA-3'

ここで N<sup>2</sup> はイノシンである

vanABmod5-23 (配列番号 21; IDB 配列番号 476)

5'-ACAGCCGACCTCacagCCCGAAA-3'

vanABmod6-21 (配列番号 22; IDB 配列番号 494)

5'-AN<sup>2</sup>CCGACCTCacagCCCGAAA-3'

ここで N<sup>2</sup> は無塩基である

vanABmod7-20 (配列番号 23; IDB 配列番号 493)

5'-N<sup>2</sup>CCGACCTCacagCCCGAAA-3'

ここで N<sup>2</sup> は無塩基である

vanABmod8-19 (配列番号 24; IDB 配列番号 492)

5'-CCGACCTCacagCCCGAAA-3'

vanABmod9-22 (配列番号 25)

5'-CAN<sup>2</sup>CCGACCTCacagCCCGAAA-3'

ここで N<sup>2</sup>は A・G および C の混合である

vanABmod9-20 (配列番号 26)

5'-N<sup>2</sup>CCGACCTCacagCCCGAAA-3'

ここで N<sup>2</sup>は A・G および C の混合である

vanABmod10-22 (配列番号 27)

5'-CAN<sup>2</sup>CCGACCTCacagCCCGAAA-3'

ここで N<sup>2</sup>は 5-トリントールである

vanABmod10-20 (配列番号 28)

5'-N<sup>2</sup>CCGACCTCacagCCCGAAA-3'

ここで N<sup>2</sup>は 5-トリントールである

vanA1005-22 (配列番号 29; IDB 配列番号 533)

5'-CAACCGACCTCacagCCCGAAA-3'

vanB687L-22 (配列番号 30; IDB 配列番号 534)

5'-CAGCCGACCTCacagCCCGAAA-3'

vanB687L-21 (配列番号 31; IDB 配列番号 535)

5'-AGCCGACCTCacagCCCGAAA-3'

vanB687L-20 (配列番号 32; IDB 配列番号 536)

5'-GCCGACCTCacagCCCGAAA-3'

#### 実施例 2

細菌供給源からの核酸標的分子の調整

以下の実施例は、腸球菌表現型についての病棟スクリーニング (house screening) での単離物の供給源、バンコマイシン耐性単離物およびバンコマイシン感受性単離物からのゲノムDNAの精製、ならびに細菌溶解物の調製について記載する。

#### 1. 腸球菌供給源

バンコマイシン耐性腸球菌および感受性腸球菌 (VREおよびVSE) 単離物を、以

下の場所から入手した: Mt. Sinai Hospital (Toronto, ON) から66個の単離物、Wishard Memorial Hospital (Indianapolis, IN) から48個の単離物、Cleveland Clinic Foundation (Cleveland, Ohio) から121個の単離物、Vancouver General Hospital (Vancouver, BC) から28個の単離物、Graduate Hospital (Philadelphia, PA) から143個の単離物、およびRoyal University Hospital (Saskatoon, SK) から34個の単離物。約440個のスクリーニングに利用可能である腸球菌単離物であった。

以下の実施例において使用される全ての単離物を、バンコマイシンおよびテイコブラニン (teicoplanin) に対する円形拡散 (disc diffusion) を、National NCCS Standardized 抗生物質感受性試験で、バンコマイシンおよびテイコブラニンに対するMIC (最小阻止濃度) を、E 試験 (AB Biodisc, Solna, Sweden) で試験し、そしてVREスクリーニング寒天 (PML Microbiological) によりアッセイした。

## 2. ゲノム腸球菌DNAの精製

以下の記載は、一般にMarmur, Meth. Enzymol. 100:726-738, 1989により実質的に記載されるようなVREおよびVSEからのゲノムDNAの精製についての手順である。精製について使用される単離物は、バンコマイシン耐性であるVanA (IDB番号339, Mt. Sinai Hospitalより入手)、Van B *Enterococcus faecalis* (ATCC 51299, American Type Culture Collection, Rockville, MD)、およびバンコマイシン感受性であるE. faecalis (VSE, ATCC 29212) 単離物であった。ゲノム調製のための腸球菌単離物を、37°Cで5%ヒツジ血液トリブチカーゼ大豆寒天 (blood TSA) プレート上で一晩増殖させた。単一コロニーを40mlのBrain Heart Infusion (BHI) ブロス中に播種し、そして6~8時間、37°Cで増殖することにより前培養物を調製する。次いで、この前培養物を1リットルのBHIブロスに添加し、そして37°Cで一晩、振盪しながら増殖させる。細胞をペレット化し、そして2%グルコース、1mMエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) および10mM Tris, pH8.1 (TEG) 緩衝液で6800×g (Sorvall) で5分間、5°C~10°Cで1回洗浄する。細胞の溶解を、5mg/mlのリゾチーム (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) の添加および37°Cで1時間の振盪しながらのインキュベーションにより実施する。ドデ

シル硫酸ナトリウム (SDS、20%の電気泳動用のグレード) を0.09%の最終濃度まで添加し、そして懸濁物を混合し、そしてウォーターバスで50°C~60°Cで10分間インキュベートし、そして室温で1時間保持する。これを24mlの5M NaClO<sub>4</sub> および40mlの25:24:1のフェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール (v/v、PCI AA) の添加に次いで、2時間室温で振盪する。このエマルジョンを滅菌した30mlのガラスチューブ (Corex) 中で等分し、そして相分離を卓上 (table top) Eppendorf遠心分離機で5000rpmで5分間遠心分離することにより実施する。核酸を含有する上層を回収し、そして2容量の95%エタノールを重層させることにより沈殿させる。これを滅菌ガラス製ロッドで粗ゲノムDNAを糸巻きにし、そして40mlの滅菌15mM NaCl、1.5mMクエン酸三ナトリウム (0.1×SSC) 緩衝液中に再懸濁する。RNAを、RNase A溶液 (2mg/ml、Pharmacia) を最終濃度50 µg/mlまで、およびRNase T1 (2500単位/ml、Gibco BRL Life Technologies, Gaithersburg, MD) を最終濃度15単位/mlまで粗DNA溶液に添加し、そして3時間、37°Cでインキュベートすることにより分解する。タンパク質除去については、2mlのSDS (20%) および2mlのプロテイナーゼK (5mg/ml、Gibco BRL) を添加し、そして溶液を50°Cで5分間、次いで30分間室温でインキュベートする。上記のPCI AA処理を20分間混合して繰り返し、次いで遠心分離し、エタノールで水相を沈殿させ、そして上記のように10mlの0.1×SSC中の最終懸濁でDNAを糸巻きにする。溶液を、この段階において、一晚、4°Cで放置するか、または1mlの10×SSC (最終濃度を1×SSCまでにする) および10mlのクロロホルム-イソアミルアルコール (24:1、v/v、CIAA) を15分間振盪しながら添加することにより処理を続行する。次いでこの溶液をガラス製チューブに等分し、そして相分離のために5000rpmで5分間遠心分離する。下部の有機相を除去し、そして界面を有する水相を、上記に記載のようにCIAAで界面のタンパク質が最小になるまで再抽出する。次いで、水相を移し換え、エタノール沈殿し、そして前述のようにDNAを糸巻きにする。DNAを5mlの0.01×SSCに再懸濁し、そして一晚保管し得る。このDNAを、4時間に渡って、4°Cで0.01×SSCに対する1回の緩衝液の交換で透析し、1回一晚繰り返し、次いでさらに4時間もう一度繰り返す。精製したゲノムDNAの量をUV分光光度法により決定し、次いで10分間超音波処理 (Branson, model 250/450)、1

000塩基対(bp)よりも小さいかまたは同じくらいにDNAのサイズを小さくさせる。

### 3. 腸球菌粗溶解物の調製

粗溶解物のための腸球菌単離物を一晩、37°Cでblood TSAプレート上で増殖させ、そして細胞を1μlのプラスチック製白金耳(PML Microbiological, Richmond, BC, Canada)で回収する。細胞(5×McFarland番号4、または3×10<sup>8</sup>細胞/50μlとほとんど同じ)を、0.05% Triton X-100および20mM TES、pH6.8から成る50μlの溶解緩衝液中で再懸濁する。代わりとしては、細胞を2mlの溶解緩衝液中に再懸濁し、次いで標準的なMcFarland番号4(6×10<sup>7</sup>細胞/50μlとほとんど同じ)に調節する。溶菌酵素、アクロモベプチダーゼ(Wako Bioproducts, Richmond, VA)およびムタノリシン(mutanolysin)(ICN Biomedicals, Aurora, OH)の組み合わせを、それぞれ最終濃度150単位/mlおよび50単位/mlまで添加した。サンプルを混合し、そして54~58°Cで20~30分間インキュベートする。

### 実施例3

#### 熱安定性RNaseHの調製

以下の実施例は、*Thermus thermophilus*由来の熱安定性RNaseHの調製についての1つの適切な方法について記載する。

熱安定性遺伝子のクローニングおよびその発現は、W095/05480およびKanayaおよびItaya, J. Biol. Chem. 267:10184-10192, 1992による方法の修飾に基づくBekkaouiら、BioTechniques 20:240-248, 1996に詳細が記載されている。簡潔には、*T. thermophilus* RNase H遺伝子(KanayaおよびItaya、前出)を、PCRによりベクターpT7-7(pIDB9)にクローニングし、そしてベクターpET11a(Novagen)にサブクローニングし、プラスミドpIDB33を得る。プラスミドpIDB33を、引き続いて細菌株であるBL21(DE3)(Novagen, Madison, WI)に形質転換させる。pIDB33を含むBL21(DE3)細胞を、0.1mg/mlアンピシリンを含むLB培地(Sambrookら、1990)で37°Cで増殖させる。培養物が0.6~0.8のOD<sub>600</sub>の時点で、IPTGを最終濃度が0.5mMになるまで添加し、そして細胞をさらに4時間培養する。RNase Hを、pIDB33構築物を有する封入体で発現させる。

細胞を3000×gで15分間、4℃で遠心分離することにより収集する。細胞ペレットを、新鮮な1gで5mlのTE緩衝液(10mM Tris, pH7.4, 1mMEDTA緩衝液)中で再懸濁する。細胞を、ソニケーター(Branson, model 450)を使用してドライアイス/エタノール浴で溶解し、そして15,000×gで30分間、4℃で遠心分離する。ペレットをTE緩衝液、pH8.0中7M尿素に再懸濁し、そして2時間、4℃で攪拌しながらインキュベートする。再懸濁した細胞を2分間、氷上で超音波破碎し、次いで12,000×gで10分間遠心分離し、そして上清を回収し、そして1lの尿素-酢酸ナトリウム緩衝液(8M尿素、20mM酢酸ナトリウム、pH5.5)に対して2回の交換で一晩透析する。20分間、31,000×gでの遠心分離の後に、清澄なタンパク質上清溶液(150ml)を回収し、そして約25mlの予め膨潤させておいた(pre-swollen)ホスホセルロース(カラム内緩衝液(P11, whatman, International Ltd., Kent, UKで2回平衡化))と3時間混合させる。得られたスラリーを尿素-酢酸ナトリウム緩衝液で2回洗浄し、そしてカラムに注ぐ。カラムをFPLCシステム(Pharmacia)に接続し、そして尿素-酢酸ナトリウム緩衝液中140mMおよび210mM NaClで2回、段階的に洗浄した。次いで、タンパク質を尿素-酢酸ナトリウム緩衝液中の0.21~0.7M NaCl線形勾配を使用して溶出する。塩勾配の末端では、全てのタンパク質を溶出するまで0.7M NaClを保持する。画分をSDS-PAGEにより分析し、そしてRNaseHを含む画分をプールし、そしてSephadex G-25カラムを、20mM酢酸ナトリウム、pH5.5中に150mM NaClを含む緩衝液と一緒に使用して脱塩する。この溶出タンパク質画分をプールし、Centriprep 10 filter(Amicon, Beverly, MA)で濃縮し、そしてグリセロール保存用緩衝液(40%グリセロール、150mM NaClおよび20mM酢酸ナトリウム、pH5.5)で-20℃で保管する。

#### 実施例 4

##### サイクリングプローブ反応

サイクリングプローブ技術(CPT(cycling prove technology))の反応および条件を、以前に公表された方法(WO95/14106; Bekkaouiら、BioTechniques 20(2):240-248, 1996)から改変する。キメラ型プローブは、放射性 $[^{32}\text{P}]$ -ATP(Samb

rookら、1990)で、T4ポリヌクレオチドキナーゼ(RTG; Pharmacia Biotech, Pisc

ataway, NJ)を使用して5' 標識化する。別に特定されない場合では、標識化プローブを、G50 NICK column (Pharmacia) クロマトグラフィーにより取り込まれていない $[^{32}\text{P}]$ -ATPから精製する。1000cpmの標識化プローブは0.3fmolのプローブに相当する。別に特定されない場合では、最終的なサイクリング反応混合物は、キメラ型プローブ、および合成型または天然の核酸標的の特定される濃度、なら

## びにスperlミンおよび以下の組成物: 0.05% Triton X-100®を有するサイクリン

グ緩衝液 (TES-CB) に基づく N-トリリス [ヒドロキシメチル] メチル-2-アミノエタンスルホン酸 (TES, Sigma Chemical Co.) 中の添加物のようなEGTAの特定される濃度、 $\text{MgCl}_2$ の特定される濃度、20mM TES緩衝液、pH6.8を含む。サンプル調製物、プローブおよび標的組製物および濃度、RNaseH、試験添加物、非相同性DNA濃度ならびに他のアッセイの詳細は、以下の実施例において具体的に記載される。

別に特定されない場合では、CPT反応を、30分間、特定の温度でインキュベートし、次いで尿素装填緩衝液 (10mM尿素、100mM EDTAおよびそれぞれ0.025%であるブループロモフェノールおよびキシレンシアノール) の氷上での添加により停止させる。次いで反応混合物を、500ボルトで水冷しながら7M尿素20%~24%アクリルアミド/ビスアクリルアミド (19:1) ゲル電気泳動 (SDS-PAGE) により分離する。このゲルをIMAGEQUANT<sup>TM</sup>ソフトウェア (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA) を利用してPhosphor Imager<sup>TM</sup>で分析する。サイクリングプローブの量を、インタクトであるプローブおよび切断されたプローブに対応するバンドの領域の集積により推定する。

別に特定されない場合では、CPT反応において、プローブ切断の割合は、インプットしたプローブの全量に対して相対する切断プローブの全量である (番号1の式)。

プローブ切断の割合 = (プローブ切断/インプットしたプローブ全量)  $\times$  100. ....  
..... (1)

単純なCPT系において、C1バックグラウンドは、反応緩衝液においてのRNaseHまたは相同的な標的の存在を伴わないプローブ切断の割合について言う。C2は



RNaseHの存在下ではあるが相同的な標的を伴わないプローブ切断の割合について言う(番号2の式)。

$$C2 = (\text{プローブ切断/インプットしたプローブ全量}) \times 100 \dots \dots \dots (2)$$

複合的なCPT系については、C3は、RNaseHの非存在下でのサンプル(外来性の成分(例えば、異種性のDNAまたはタンパク質)を含む生物学的サンプル)中におけるプローブ切断の割合について言う。C4は、RNaseHの存在下ではあるが相同的な標的の非存在下での生物学的サンプルにおけるプローブ切断の割合について言う(番号3の式)。

$$C4 = (\text{プローブ切断/インプットしたプローブ全量}) \times 100 \dots \dots \dots (3)$$

プローブ切断の正味の割合は、相同的な標的に起因するプローブ切断の割合であり、そして切断の割合からC2バックグラウンド(単純な系)、またはC4(複合型系)を引き算することにより算出する(それぞれ番号4または番号5の式)

$$\text{正味の切断の割合} = \text{切断の割合} - C2 \dots \dots \dots (4)$$

$$\text{正味の切断の割合} = \text{切断の割合} - C4 \dots \dots \dots (5)$$

CPTについてのシグナル対ノイズ比(S:N)は、C2(単純な系、番号6の式)またはC4(複合型系、番号7の式)に対する異種性標的の存在におけるプローブ切断の割合の比として定義する。

$$S : N = \text{切断の割合} / C2 \dots \dots \dots (6)$$

$$S : N = \text{切断の割合} / C4 \dots \dots \dots (7)$$

#### 実施例5

##### CPT反応による合成VRE標的の検出

以下の実施例は、クリーンな系における、CPT反応による合成vanAおよびvanB標的の検出のためのvanAおよびvanBキメラプローブの有効性を試験する。

詳細には、5つのキメラプローブを設計し、そして相同標的およびRNase H(C

1)の非存在下、ならびにRNase Hの存在下および標的(C2)の非存在下の両方での

、非特異的切断についてのCPT反応において試験した。VREキメラプローブおよび標的(表1において特定する)を、実施例1において記載されるように合成し、そしてプローブを、実施例4において記載するように標識した。精製されたT. thermophilus RNase Hを、実施例3において記載するように生成した。CPT反応および分析を、以下を除いて本質的に実施例4に記載するように実施した: 0.3fmolの特定のキメラプローブ、 $1 \times 10^{-4}$ pmolの特定の標的、0.1 $\mu$ g RNase H、4mM MgCl<sub>2</sub>、TES-CB中10 $\mu$ lの最終反応容量、および65°Cの反応温度。

単純な系において、 $10^{-4}$ pmolの標的濃度にてプローブを試験する結果を、表1に示す。これらの予備結果は、特定のvan Aまたはvan Bキメラプローブが、61%~91%に及ぶ切断された正味のプローブ切断%を生じ、従ってそれらの相補的合成標的を検出するために使用され得ることを示す。

表1. 単純なCPT系におけるVREプローブの特異的切断および非特異的切断の試験

プローブ	標的	バックグラウンド: (%)		切断された正味の プローブ (%)
		C1	C2	
vanA811L-27 (配列番号 1)	vanA811L-27T (配列番号 2)	2	3	91
vanB467-27 (配列番号 3)	vanB467-27T (配列番号 4)	2	6	91
vanB242-27 (配列番号 5)	vanB242-27T (配列番号 6)	5	14	98
vanB2242-27 (配列番号 9)	vanB2242-27T (配列番号 10)	14	6	61
vanB857-20 (配列番号 7)	vanB857-20T (配列番号 8)	1	4	69

上記の実施例は、設計したキメラvan Aおよびvan Bプローブが、単純なCPT系におけるそれらのそれぞれの相補的合成標的を検出し得ることを実証した。

#### 実施例 6

##### ゲノムDNAを使用するCPT反応によるVREの検出

以下の実施例は、添加剤スperlミンおよびEGTAが、精製されたゲノムDNAを使用するCPT反応におけるVREの検出を改良することを実証する。

本実施例において、2つのキメラプローブを、VREにおけるvan Aおよびvan 遺伝子の検出について試験した。スぺルミンおよびEGTAの存在または非存在の効果を、van A遺伝子の検出のためにCPT反応において試験した。van B検出については、CPT反応におけるスぺルミンおよびEGTAの効果のみを試験した。VREキメラプローブ(表2に特定する)を、実施例1において記載するように合成し、そして実施例4において記載するように標識した。ゲノムDNAを、実施例2において記載されるVanA VRE単離物(Mt. Sinai Hospitalより)、VanB *E. faecalis* (ATCC 番号51299)、およびVSE, *E. faecalis* (ATCC番号29212)から調製した。精製した*T. thermophilus* RNase Hを、実施例3において記載するように生成した。CPT反応および分析を、以下を除いては、実施例4において記載するように行った: TES-CB中、0.9fmolの特定のキメラプローブ、100~150ngのゲノムDNA、1  $\mu$ gのRNase H、4.0mMのMgCl<sub>2</sub> (0.5mMスぺルミンを含むか、または含まない)、1.0mMのEGTA、総容量30  $\mu$ lまで。

表2は、上記の実験の結果を要約する。van A遺伝子を検出するために、スぺルミンおよびEGTAの非存在下で、C4バックグラウンドはより大きく、そしてシグナル対ノイズ比は、2未満であることが観察された。これは、添加剤(スぺルミンおよびEGTA)を含むCPT反応(ここで、シグナル対ノイズ比は、約5まで増加した)と対照的であった。van B遺伝子の検出のためのCPT反応におけるスぺルミンおよびEGTAの存在は、約3というシグナル対ノイズ比を生じた。従って、スぺルミンおよびEGTAの存在は、CPT反応を改善し、VREのvan Aおよびvan B遺伝子の両方の検出を可能にする。ゲノムDNAを使用して実施される実験の数が限定されるために、上記の添加剤濃度が、ゲノム系におけるすべてのプローブについて最適化されるわけではなかったことに留意すべきである。

表2. CPT反応においてvan Aおよびvan Bキメラプローブを使用する、ゲノムDNAからのvan Aおよびvan B遺伝子の検出のための、シグナル対ノイズ比に対するスぺルミンおよびEGTAの効果

プローブ	添加剤	C4 <sup>2</sup> バックグラウンド (%)	検出された VREプローブ (%)	S:N <sup>1</sup>
vanA811L-27 (例1)	なし	30	55	1.8
vanA811L-27	SP + EGTA	7	34	4.9
vanB242-27 (例5)	なし	ND <sup>4</sup>	ND <sup>4</sup>	-
vanB242-27	SP + EGTA	20	62	3.1

<sup>1</sup>S:Nは、シグナル対ノイズ比をいう。

<sup>2</sup>C4バックグラウンドは、VSEの存在下で切断されたプローブの割合をいう。

<sup>3</sup>SPは、スペルミンをいう。

<sup>4</sup>NDは、実施されないことをいう。

上記の実験は、精製されたゲノムDNAを使用するVREのvan Aおよびvan B遺伝子の検出のためのCPT反応におけるスペルミンおよびEGTAの利用を実証する。

#### 実施例7

粗溶解物におけるVREの検出のためのCPT反応における条件

以下の実施例は、CPT反応を使用する、粗溶解物由来のVREのvan A、van B、およびvan B2遺伝子の検出のためのVREキメラプローブについての条件を要約する。

粗溶解物を含むCPT反応において使用されるべきスペルミンおよびEGTAの濃度、ならびに温度についての予備最適化実験を実施した。試験されたスペルミンおよびEGTAの濃度は、0.5mM~2.0mMであった。各プローブまたはプローブのセットについて、温度プロファイル研究を、2℃増加段階を使用する、約55℃~65℃でのCPT反応を試験することによって実施した。最適な条件を、VREとVSEとの間の最

も良好な差に基づいて選択し；そしてこれらの条件を、表3に要約した。

表3. 粗溶解物に関して使用したVREキメラプローブについての、スペルミンおよびEGTAの濃度、ならびにサイクリング温度

プローブ	スぺルミン	EGTA	温度
vanA811L-27 (西列番号 1)	0.75 mM	1.0 mM	63°C
vanB467-27 (西列番号 3)	1.0 mM	1.0 mM	59°C
vanB242-27 (西列番号 5)	2.0 mM	1.5 mM	63°C
vanB242-27および vanB2242-27 (西列番号 5と9)	2.0 mM	1.5 mM	63°C
vanA811L-27および vanB857-20 (西列番号 1および7)	0.95 mM	4.0 mM	63°C

#### 実施例 8

CPT反応による、粗溶解物におけるVRE遺伝子の検出

以下の実施例は、実施例7において最適化されたVREキメラプローブが、CPT反応を使用する粗細菌性溶解物からvan A、van B、およびvan B2遺伝子を検出するために使用され得ることを実証する。

以下の実験は、VREまたはVSEの粗溶解物を使用するCPT反応におけるスぺルミンおよびEGTAの効果を試験するように設計された。van Aプローブを、スぺルミンおよびEGTAの存在下および非存在下の両方で試験し、そして残りのプローブについては、粗溶解物におけるスぺルミンおよびEGTAの組み合わせの効果のみを試験した(表4)。

VREのvan A、van B、およびvan B2遺伝子の検出のために使用される5つのキメラプローブを、表4に特定する。これらのプローブを実施例1において記載するように合成し、そして実施例4において記載するように標識した。精製したT

thermophilus RNase Hを、実施例3において記載するように生成した。粗溶解物を、VanA *E. faecalis* VRE単離物(Mt. Sinal Hospitalから入手した、IDB番号339)、VanB *E. faecalis* (ATCC番号51299)、およびVSE, *E. faecalis* (ATCC番号29212)から調製した。VREおよびVSE細胞を、McFarland番号4標準に再懸濁し、そして実施例2において記載されるように溶解した。反応前に、粗溶解物を熱

変性 (95°Cにて5分間) させ、次いで各CPTプローブについて最適な温度に設定した水浴に移した。CPT反応および分析を、以下を除いては、実施例4において記載するように実施した: TES-CB中、1.8 fmolの特定のキメラプローブ (表4)、50  $\mu$ lのVREまたはVSE粗溶解物、3.3  $\mu$ gのRNase H、および2mMのMgCl<sub>2</sub>、最終反応容量100  $\mu$ lまで。各プローブについての、特定のスペルミンおよびEGTAの条件を、実施例7、表3に示す。

表4は、添加剤スペルミンおよびEGTAを使用するCPT反応における5つの特定のキメラプローブを使用する粗溶解物におけるVREの検出結果を要約する。手短には、スペルミンおよびEGTAの非存在下で、vanA811L-27プローブは、高C4バックグラウンドに起因して、粗溶解物におけるvan A遺伝子を検出し得なかった。しかし、反応にスペルミンおよびEGTAを添加すると、C4は減少し、vanA遺伝子の首尾良い検出を可能にした。van Bおよびvan B2プローブの反応混合物におけるスペルミンおよびEGTAの存在は、それぞれの標的の首尾良い検出を可能にした。

表4. 反応においてスペルミンおよびEGTAを使用する、粗溶解物からのVREにおける相同標的のCPT検出のためのvan A、van B、およびvan B2キメラプローブの使用

プローブ	添加剤	C4 <sup>1</sup> バックグラウンド (%)	粗溶解物中の VREプローブ (%)	S:N <sup>2</sup>
vanA811L-27 (配列番号 1)	なし	82	82	1
vanA811L-27	SP + EGTA	5	56	11
vanB467-27 (配列番号 3)	SP + EGTA	5	56	11
vanB242-27 (配列番号 5)	SP + EGTA	19	63	3
vanB2242-27 (配列番号 9)	SP + EGTA	20	81	4
vanB857-20 (配列番号 7)	SP + EGTA	6	57	9

<sup>1</sup>C4バックグラウンドは、VSEの存在下で切断されたプローブ割合をいう。

$^{25}S:NI$ は、シグナル対ノイズ比（すなわち、切断されたVREプローブ/C4）をいう。  
 $^{35}SPI$ は、スペルミンをいう。

上記の実施例は、腸球菌単離物の粗溶解物を使用する、van A、van B、および van B2遺伝子の検出のためのCPTにおけるキメラ van A、van B、および van B2 プローブの利用を実証する。

#### 実施例 9

粗溶解物における特定のキメラプローブを使用する、CPT反応による van Aおよび van B遺伝子についての腸球菌単離物のスクリーニング

以下の実施例は、van Aおよび van B遺伝子の検出のための腸球菌単離物をスクリーニングするためのCPT反応の使用を実証する。

第1の実験は、腸球菌の440の単離物からの vanA遺伝子の検出のための vanA811

L-27（配列番号1）キメラプローブを試験するために設計された。第2の実験は、総計440の単離物からの vanB遺伝子についてのVRE単離物のスクリーニングについて vanB467-27（配列番号3）を試験するように設計された。これらの実験において、キメラプローブを実施例1において記載されるように合成し、そして実施例4において記載されるように標識した。精製した *I. thermophilus* RNase Hを、実施例3において記載されるように生成した。VREおよびVSE細胞を、 $5 \times \text{McFarland}$  番号4 標準細胞密度まで再懸濁し、そして実施例2において記載されるように溶解した。反応前に、粗溶解物を熱変性（95℃にて5分間）し、次いで各CPTプローブについて最適な温度にセットした水浴に移した。CPT反応および分析を、以下を除いては、実施例4において記載するように実施した：TES-CB中、1.8f molの特定のキメラプローブ、50  $\mu$  lのVREまたはVSE粗溶解物、3.3  $\mu$  gのRNase H、および2 mMのMgCl<sub>2</sub>、最終反応容量100  $\mu$  lまで。van ACPTアッセイについて、TES-CBは、0.75mMのスペルミンおよび1 mMのEGTAを含み、そして反応を63℃で行った；van BCPTアッセイについて、TES-CBは、1 mMスペルミンおよび1 mM EGTAを含み、そして反応を59℃にて行った。

図2は、vanA811L-27キメラプローブを使用するCPT反応による、VREおよびVSEの440の単離物の vanAスクリーン試験の結果を示す。手短には、vanAキメラプロ

ープは、154の全てのVanA単離物をvanA陽性として正確に同定した。残りの単離物のすべてを、vanA陰性としてともに分類した。これらの値は、約14のシグナル対ノイズ比を有するvanA陰性(すなわち、VanB、VanCのVREおよびVSE)からのvanA陽性(すなわち、VanA)の識別を可能にした。vanA陰性単離物における低いプローブ切断は、vanA811L-27がvanBまたはvanC遺伝子のいずれとも交差反応しないことを実証した。

図3は、vanB467-27キメラプローブを使用するCPT反応によるvanB遺伝子について、VREおよびVSEの440の単離物のvanBスクリーン試験の結果を示す。vanBキメラプローブは、131のすべてのVanB単離物をvanB陽性として正確に同定した(図3)。残りの単離物は、vanB陰性であり、そして別々の群を形成した(図3)。これらの値は、約14のシグナル対ノイズ比を有するvanB陰性(すなわち、VanA、VanC、およびVSE)から、vanB陽性の示差を可能にした。vanB陰性単離物

における低いプローブ切断は、vanB467-27キメラプローブが、vanAまたはvanCと遺伝子と交差反応しないことを実証した。

上記の実施例は、それぞれキメラプローブvanA811L-27(配列番号1)およびvanB467-27(配列番号3)を使用する、CPT反応によるVRE臨床的単離物のvanAおよびvanB遺伝子の首尾良いスクリーニングを実証する。

#### 実施例10

##### vanAおよびvanBのVRE単離物の多重CPT検出

以下の実施例は、VREからvanAおよびvanB遺伝子を検出するためのvanAおよびvanBキメラプローブの同時使用を実証する。

この実験は、VRE(VanAおよびVanB)とVSE単離物との間の示差のための単純なCPT反応における、2つのキメラプローブ(vanA811L-27(配列番号1)およびvanB857-20(配列番号7))の使用を試験するように設計された。

本実験において、キメラプローブを、実施例1において記載するように合成し、そして実施例4において記載するように標識した。精製した*T. thermophilus* RNase Hを、実施例3において記載されるように生成した。VREおよびVSE細胞を、5×McFarland番号4標準細胞密度まで再懸濁し、そして実施例2において記



載されるように溶解した。反応前に、粗溶解物を熱変性(95℃にて5分間)し、次いで各CPT反応について最適な温度にセットした水浴に移した。CPT反応および分析を、以下を除いては、実施例4において記載するように実施した: TES-CB中、1.8fmolの各キメラプローブ、50μlのVREまたはVSE粗溶解物、3.3μgのRNase H、および2mMのMgCl<sub>2</sub>、0.95mMのスペルミン、および4mMのEGTA、最終反応容量100μlまで。サイクルを63℃にて行った。

図4は、CPT産物のゲル電気泳動、ならびにvanAおよびvanBのVREを同時に検出するためのvanAおよびvanBの両方のキメラプローブの使用を試験する実験からの結果を示す。表5は、上記の実験からの結果を要約する。手短には、VSE単離物は、最小のプローブ切断を示した。VanA型として同定されるVRE単離物はvanA811L-27プローブの切断を示すが(47%)、varB467-27プローブは、切断されないままであった。対照的に、vanB857-20プローブは、VanBとして同定された単離物に

おいて切断された(57%)。vanAおよびvarBアッセイの両方は、それぞれ、9および8のシグナル対ノイズ比を有するVSEとのVREの差を生じた。

表5. 多重CPTによってVREからvanAおよびvanB遺伝子を検出するための2つのキメラプローブの同時使用の結果

プローブ <sup>1</sup>	C4 <sup>1</sup> バックグラウンド (%)	VRE遺伝子 単離物	切断された VREプローブ(%)	S:N <sup>2</sup>
vanA811L-27 (配列番号 1)	5	vanA	47	9.4
		vanB	8	1.6
vanB857-20 (配列番号 7)	7	vanB	57	8.1
		vanA	6	0.9

<sup>1</sup>C4バックグラウンドは、VSEの存在下で切断されるプローブの割合をいう。

<sup>2</sup>S:Nは、シグナル対ノイズ比(すなわち、切断されたVREプローブ割合/C4)をいう。

上記の実施例は、VRE由来のvanAおよびvanB遺伝子が、多重CPTを使用して検出および示差され得ることを実証する。

#### 実施例11

## 単一プローブまたは二重プローブを使用する非同位体VREアッセイ

PCTを酵素イムノアッセイ(CPT-EIA)と組み合わせる非同位体VREアッセイを、図5において図示する。本アッセイは、varAまたはvarB遺伝子の相補的塩基配列に結合した場合、RNase H感受性切断可能連結を提供する、DNA-RNA-DNAキメラプローブを利用する。非切断プローブを、固体表面へのプローブの結合、および西洋ワサビペルオキシダーゼ(これは、基質を、末端に色の付いた生成物に転換する)と結合した抗体の付着によって検出する。プローブ(varAまたはvarB陽性)の切断は、固体表面へのプローブ-抗体複合体の結合を妨げ、このようにして、末端に色の付いた生成物の形成を妨げる。

以下の実施例は、粗溶解物由来のVREの検出のための、一般的に迅速な単一または二重プローブの非同位体CPT-EIAアッセイを記載する。溶解方法が、VREおよ

びVSEについて開発され、そして最適化されている。

varA、varB、またはvarB2を検出するために特異的な単一または二重のキメラプローブを、実施例1において記載するように合成し、フルオレセイン化(fluoresceinated)し、そしてビオチン化する。精製された熱安定性RNase Hを、実施例3において記載されるように調製する。腸球菌単離物および増殖条件の供給源は、実施例2に記載されるとおりである。

## A. 溶解工程

細胞を、100  $\mu$ lの溶解試薬中に培養増殖の1  $\mu$ lのループフル(loopful)を置くことによって溶解する。溶解試薬の組成は以下のとおりである：0.2mg/mlのリゾチーム(Sigma)、0.025mg/mlのムタノリシン(mutanolysin)(ICN Biomedicals

Aurora, OH)), 0.05% (v/v) Triton X 100®, および20mM TES緩衝液(pH 6.8)。

サンプルを、54°Cで15分間インキュベートし、その後、10  $\mu$ lのSDS、明澄化試薬を0.07%の最終濃度まで添加する。サンプルを混合し、そして室温にて5分間インキュベートする。二重プローブアッセイについて、この時点で、溶解サンプルを2つの50  $\mu$ lアリコートに分ける。

## B. サイクル条件

単一アッセイおよび二重アッセイのためのサイクル試薬は以下のとおりである

る: 20mMのTES (pH 7.6) 中、50  $\mu$ lの粗溶解物、1.0%のTriton X-100<sup>®</sup>、2mMのMg

Cl<sub>2</sub>、25  $\mu$ MのEDTA (pH8.0)、0.625  $\mu$ Mのスペルミン、0~3%エタノール、凍結乾燥添加物 (100mMトレハロース、20ppmのProclin、0.1%のPVP、2~5  $\mu$ g/ $\mu$ lのBSA)。粗溶解物由来のDNAを95°Cにて5分間変性し、次いでCPT反応を行う前に54°Cのドライバスに移す。以下の実施例において、プローブの型および濃度、ならびに熱安定性RNase Hの濃度を特定化する。次いで、50  $\mu$ lを、単一プローブについては160  $\mu$ l、そして二重プローブについては110  $\mu$ lの最終反応容量で、各サンプルに添加し、そしてCPTを、54°Cにて30分間行う。

## C. 検出

サイクル後、ヒツジポリクローナル抗フルオレセイン-西洋ワサビペルオキシダーゼ結合抗体の希釈物を含む100  $\mu$ lの結合試薬 (ペルオキシダーゼ安定化緩衝液、DAKO, Mississauga, ON) を、チューブに添加する。CPT反応容量を、ストレプトアビジン被覆ウエル (Boehringer Mannheim GmbH, Germany) に移し、そして室温で10分間インキュベートする。液体を廃棄し、そしてプレートに300  $\mu$ lの洗浄液 (137mM NaCl、2.7mM KCl、1.8mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、10.1mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.5% Tween 20、pH7.3) で2回洗浄する。これに続いて、200  $\mu$ lの基質 (テトラメチルベンジジン/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、Bio-rad) を添加し、そして室温にて5分間発色させる。発色を、100  $\mu$ lの検出停止試薬 (750mM Tris、1.5% (w/v) ドデシル硫酸ナトリウム、pH7.7) を使用することによって停止させる。プレートを、 $\Phi$ 650nmに設定したVmaxプレートリーダーを使用して読む。

実施例12

## 二重プローブを使用する非同位体VREアッセイ

本実施例は、粗溶解物由来のVREの検出のための迅速な2つのプローブ非同位体CPTアッセイを記載する。

440の腸球菌単離物由来のvanAおよびvanB遺伝子を同定するための大規模スク

リーニングを、vanA、vanA812L-25（配列番号12）、およびvanB、vanB467-27（配列番号3）についての特定のキメラプローブに関する非同位体CPT-EIA VREアッセイを使用して行った。全ての440単離物を、従来の感受性方法によって以前に特徴付けられ、そして放射活性CPTアッセイでのスクリーニングのために使用した。従って、単離物の収集物は、以前に特徴付けられた111のVSE、154のVanA、131のVanB、および44のVanCを含んだ。二重プローブアッセイおよび分析を、1反応あたり、5 fmolのvanA811L-27および5 fmolのvanB467-27プローブおよび1.64  $\mu$ gのRNase Hを用いて、実施例12に記載されるように行った。

図6および7は、粗腸球菌単離物由来のvanAおよびvanB遺伝子を検出するためのCPT-EIAアッセイの結果を要約する。図6は、VanAおよび非VanA単離物の両方がそれらの光学密度に基づいて容易に分離され得ることを示す。すべてのVanA単離物は、0.1未満のOD値を有することが観察されているが、非VanA単離物は、0.2

より大きいOD値を有した。従って、vanA811L-27プローブでスクリーニングされた154VanA単離物のすべてが、vanA遺伝子標的配列を有するとして正確に同定された。同様に、図7は、vanB467-27プローブが、非VanB単離物由来の131VanB単離物のすべてを正確に同定したことを示す。VanB単離物についてのOD値は0.1未満であると観察されたが、vanB遺伝子配列を含まない試験された残りの単離物は、0.2より大きいOD値を有した。

上記の実施例は、VanAまたはVanB単離物由来のvanAおよびvanB遺伝子を検出するため、および非VanA/B単離物からそれらを区別するためのCPT-EIAアッセイにおける特定のvanAおよびvanBプローブの使用を首尾良く実証する。

#### 実施例13

##### 単一のキメラプローブを使用する非同位体VREアッセイ

以下の実施例は、粗溶解物由来のVREの検出のための迅速な単一のプローブ非同位体CPTアッセイを記載する。

30の腸球菌単離物由来のvanAおよびvanB遺伝子を同定するための小規模スクリーニングを、単一のキメラプローブvanABmod5-23（配列番号21；IDB番号476）を用いる非同位体CPT-EIA-VREアッセイを使用して行った。単離物は、10のVSE、10

のVanA、および10のVanBから構成され、そして実施例2に記載される440腸球菌単離物のチャレンジサブセットを形成した。アッセイおよび分析を、実施例11に記載のように、単一のプローブアッセイについて、1反応あたり、15fmolのvanABmod5-23および2.0μgのRNase Hを使用して行った。

実験結果は、vanABmod5プローブが、VSE単離物からのVanAまたはVanB単離物を容易に区別し得ることを示した。すべての単離物は、0.28より大きいODおよび0.31の平均ODを有したが、VRE単離物についてのOD値は、0.96以下であることが観察された。VanA単離物は、0.071の平均ODを有し、そしてVanB単離物は、0.073の平均ODを有した。これらの結果に基づいて、上記の条件下でのvanABmod5プローブの使用は、VRE単離物とVSE単離物との間の良好な区別を生じた。

上記の実施例は、VRE単離物由来のvanAおよびvanB遺伝子の両方を検出するため、ならびにそれらをVSE単離物から区別するために単一のプローブCPT-EIAの使

用を首尾良く実証する。

#### 実施例14

単一のキメラプローブを使用する非同位体VREアッセイの特異性

以下の実施例は、VanAまたはVanB以外のVRE型、および腸球菌以外のバンコマイシン耐性細菌種を試験することによって、vanAおよびvanB遺伝子に対する特異性について、単一のVREプローブを試験する。

VRE、VSE、および非腸球菌パネル試験について、単一のプローブアッセイを、以下の変化を有して、実施例11において記載されるように行った：(i) サイクル条件：15fmol vanABmod5-23プローブ（配列番号21；IDB配列番号476）、2μg RNase H（凍結乾燥添加物なし）；および(ii) 結合試薬の希釈段階1/750希釈を使用した。

以下の2つの表は、上記の実験の結果を要約する。表6からの結果は、vanABmod5プローブが、試験されたVSEまたは非腸球菌単離物についてではないが、コントロール単離物のvanAまたはvanB遺伝子についてのみ特異的であると見出されたことを示す。

表6は、vanAまたはvanB遺伝子を検出するために設計された、単一のキメラプロ

ープvanABmod5-23 (配列番号21) を使用する、非同位体VREアッセイによる、非腸球菌種の特異性試験の結果を示す。

腸球菌および 非腸球菌試験単離物	単離物 #	OD <sub>650nm</sub>
VSE コントロール	84	0.235
vanA コントロール	339	0.070
vanB コントロール	326-1	0.070
<i>Leuconostoc</i> spp.	372	0.242
<i>Leuconostoc</i> spp.	373	0.251
<i>Aerococcus viridans</i>	939	0.197
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	940	0.191
<i>Aerococcus urinae</i>	941	0.235
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	942	0.300
<i>Lactococcus lactis</i>	943	0.199

表7は、キメラプローブが、vanAまたはvanBコントロールについて特異的であり、そしてVanC単離物またはVSEコントロールと交差反応しなかったことを示す。表7は、vanAまたはvanB遺伝子を検出するために設計された、単一のキメラプローブvanABrod5-23 (配列番号21) を使用する、非同位体VREアッセイによる、非VanAまたはVanB腸球菌種の特異性試験の結果を示す。

腸球菌 試験単離物	単離物 #	OD <sub>650nm</sub>
VSE コントロール	84	0.235
vanA コントロール	339	0.070
vanB コントロール	326-1	0.070
VanC	804	0.275
VanC	805	0.337
VanC	806	0.336
VanC	807	0.347
VanC	808	0.355
VanC	809	0.377
VanC	811	0.396
VanC	812	0.356
VanC	813	0.269
VanC	814	0.390

上記の実験結果から、vanABrod5-23プローブを使用する非同位体単一プローブVREアッセイが、腸球菌vanAまたはvanB遺伝子について特異的であることが首尾良く示され、そして試験された腸球菌VanC、VSE、または他の非腸球菌種と交差反応しなかった。

上記から、本発明の特定の実施態様が、例示の目的のために本明細書中に記載され、種々の改変が、本発明の精神および範囲から逸脱することなくなされ得ることが理解される。従って、本発明は、添付の請求の範囲によってを除いては限定されない。

## SEQUENCE LISTING

## (1) GENERAL INFORMATION:

- (i) APPLICANT: Modrusan, Zora D.
- (ii) TITLE OF INVENTION: DETECTION OF VANCOMYCIN RESISTANT  
ENTEROCOCCI BY CYCLING PROBE REACTIONS
- (iii) NUMBER OF SEQUENCES: 32
- (iv) CORRESPONDENCE ADDRESS:
  - (A) ADDRESSEE: SEED and BERRY LLP
  - (B) STREET: 6300 Columbia Center, 701 Fifth Avenue
  - (C) CITY: Seattle
  - (D) STATE: Washington
  - (E) COUNTRY: USA
  - (F) ZIP: 98104
- (v) COMPUTER READABLE FORM:
  - (A) MEDIUM TYPE: Floppy disk
  - (B) COMPUTER: IBM PC compatible
  - (C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
  - (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30
- (vi) CURRENT APPLICATION DATA:
  - (A) APPLICATION NUMBER: US
  - (B) FILING DATE: 02-JUL-1998
  - (C) CLASSIFICATION:
- (viii) ATTORNEY/AGENT INFORMATION:
  - (A) NAME: McMasters, David D.
  - (B) REGISTRATION NUMBER: 33,963
  - (C) REFERENCE/DOCKET NUMBER: 480094.423
- (ix) TELECOMMUNICATION INFORMATION:
  - (A) TELEPHONE: (206) 622-49000
  - (B) TELEFAX: (206) 682-6031

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:1:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
  - (A) LENGTH: 27 base pairs
  - (B) TYPE: nucleic acid
  - (C) STRANDEDNESS: single
  - (D) TOPOLOGY: linear

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:1:

TTAATAACCC AAAAGGCGGG AGTAGCT

27

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:2:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
  - (A) LENGTH: 27 base pairs
  - (B) TYPE: nucleic acid



(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:2:

AGCTACTCCC GCCTTTTGGG TTATTAA

27

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:3:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 27 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:3:

TACATTCTTA CAAAAAATGC GGGCATC

27

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:4:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 27 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:4:

GATGCCCGCA TTTTGTAA GAATGTA

27

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:5:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 27 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:5:

GCCGATAGTC TCCCCGCCAT ATTCTCC

27

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:6:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 27 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:6:

GGAGAATATG GCGGGGAGAC TATCGGC

27

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:7:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
  - (A) LENGTH: 20 base pairs
  - (B) TYPE: nucleic acid
  - (C) STRANDEDNESS: single
  - (D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:7:

GAGGAACGAA ATCGGGTGCA

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:8:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
  - (A) LENGTH: 20 base pairs
  - (B) TYPE: nucleic acid
  - (C) STRANDEDNESS: single
  - (D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:8:

TGCACCCGAT TTCGTTCTC

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:9:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
  - (A) LENGTH: 27 base pairs
  - (B) TYPE: nucleic acid
  - (C) STRANDEDNESS: single
  - (D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:9:

GCCGACAGTC TCCCCGCCAT ACTCTCC

27

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:10:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 27 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:10:

GGAGAGTATG GCGGGGAGAC TGTCGGC

27

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:11:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 25 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:11:

TTAATAACCC AAAAGGCGGG AGTAG

25

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:12:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 25 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:12:

TAATAACCCA AAAGGCGGGA GTAGC

25

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:13:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 21 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:13:

CGAGCCGGAA AAAGGCTCTG A

21

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:14:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
  - (A) LENGTH: 17 base pairs
  - (B) TYPE: nucleic acid
  - (C) STRANDEDNESS: single
  - (D) TOPOLOGY: linear

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:14:

CCGGAAAAAG GCTCTGA

17

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:15:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
  - (A) LENGTH: 21 base pairs
  - (B) TYPE: nucleic acid
  - (C) STRANDEDNESS: single
  - (D) TOPOLOGY: linear

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:15:

CGAGCCGGAA AAAGGCTCAG A

21

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:16:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
  - (A) LENGTH: 17 base pairs
  - (B) TYPE: nucleic acid
  - (C) STRANDEDNESS: single
  - (D) TOPOLOGY: linear

## (ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: -
- (B) LOCATION: 15
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "Where N is an abasic nucleotide"

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:16:

CCGGAAAAAG GCTCNGA

17

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:17:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
  - (A) LENGTH: 24 base pairs
  - (B) TYPE: nucleic acid
  - (C) STRANDEDNESS: single
  - (D) TOPOLOGY: linear

(ix) FEATURE:  
 (A) NAME/KEY: -  
 (B) LOCATION: 2  
 (D) OTHER INFORMATION: /note= "Where N can be an abasic nucleotide, a universal nucleotide, or a mixture of natural nucleotides"

(ix) FEATURE:  
 (A) NAME/KEY: -  
 (B) LOCATION: 5  
 (D) OTHER INFORMATION: /note= "Where N can be an abasic nucleotide, a universal nucleotide, or a mixture of natural nucleotides"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:17:

CNCANCCGAC CTCACAGCCC GAAA

24

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:18:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
 (A) LENGTH: 24 base pairs  
 (B) TYPE: nucleic acid  
 (C) STRANDEDNESS: single  
 (D) TOPOLOGY: linear

(ix) FEATURE:  
 (A) NAME/KEY: -  
 (B) LOCATION: 2  
 (D) OTHER INFORMATION: /note= "Where N is an Abasic nucleotide"

(ix) FEATURE:  
 (A) NAME/KEY: -  
 (B) LOCATION: 5  
 (D) OTHER INFORMATION: /note= "Where N is an abasic nucleotide"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:18:

CNCANCCGAC CTCACAGCCC GAAA

24

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:19:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
 (A) LENGTH: 22 base pairs  
 (B) TYPE: nucleic acid  
 (C) STRANDEDNESS: single  
 (D) TOPOLOGY: linear

(ix) FEATURE:  
 (A) NAME/KEY: -  
 (B) LOCATION: 3  
 (D) OTHER INFORMATION: /note= "Where N is an abasic"

nucleotide"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:19:

CANCCGACCT CACAGCCCGA AA

22

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:20:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 22 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: -
- (B) LOCATION: 3
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "Where N is inosine"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:20:

CANCCGACCT CACAGCCCGA AA

22

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:21:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 23 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:21:

ACAGCCGACC TCACAGCCCG AAA

23

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:22:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 21 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: -
- (B) LOCATION: 2
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "Where N is an abasic nucleotide"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:22:

ANCCGACCTC ACAGCCCGAA A

21

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:23:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
  - (A) LENGTH: 20 base pairs
  - (B) TYPE: nucleic acid
  - (C) STRANDEDNESS: single
  - (D) TOPOLOGY: linear

## (ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: -
- (B) LOCATION: 1
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "Where N is an abasic nucleotide"

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:23:

NCCGACCTCA CAGCCCGAAA

20

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:24:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
  - (A) LENGTH: 19 base pairs
  - (B) TYPE: nucleic acid
  - (C) STRANDEDNESS: single
  - (D) TOPOLOGY: linear

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:24:

CCGACCTCAC AGCCCGAAA

19

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:25:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
  - (A) LENGTH: 22 base pairs
  - (B) TYPE: nucleic acid
  - (C) STRANDEDNESS: single
  - (D) TOPOLOGY: linear

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:25:

CAVCCGACCT CACAGCCCGA AA

22

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:26:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
  - (A) LENGTH: 20 base pairs
  - (B) TYPE: nucleic acid
  - (C) STRANDEDNESS: single
  - (D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:26:

VCCGACCTCA CAGCCCGAAA

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:27:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 22 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: -  
(B) LOCATION: 3  
(D) OTHER INFORMATION: /note= "Where N is 5-nitindole"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:27:

CANCCGACCT CACAGCCCGA AA

22

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:28:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 20 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: -  
(B) LOCATION: 1  
(D) OTHER INFORMATION: /note= "Where N is 5-nitrindole"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:28:

NCCGACCTCA CAGCCCGAAA

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:29:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 22 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:29:



CAACCGACCT CACAGCCCGA AA

22

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:30:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 22 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:30:

CAGCCGACCT CACAGCCCGA AA

22

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:31:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 21 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:31:

AGCCGACCTC ACAGCCCGAA A

21

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:32:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
(A) LENGTH: 20 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:32:

GCCGACCTCA CAGCCCGAAA

20

【図 1】

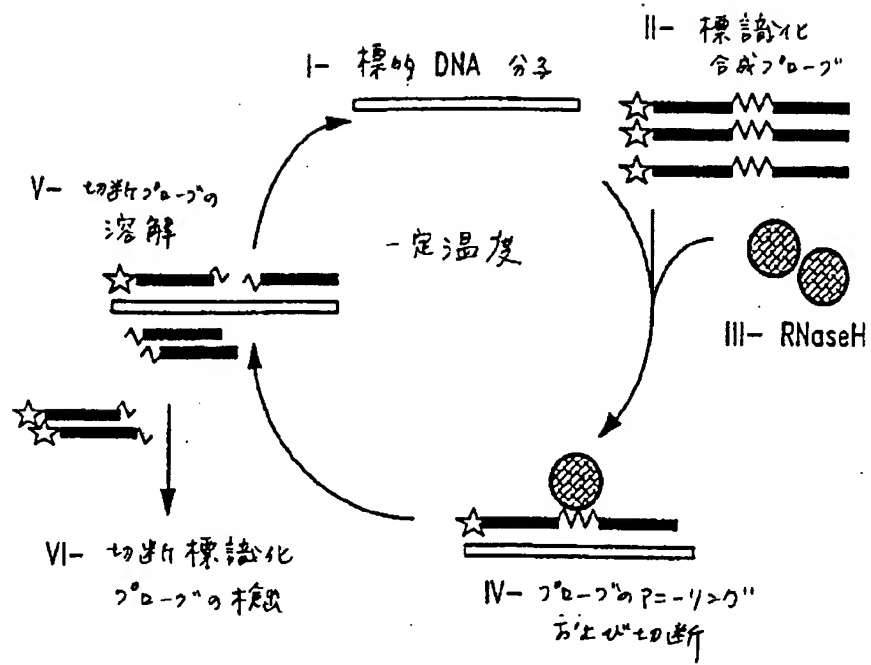


Fig. 1

【図2】

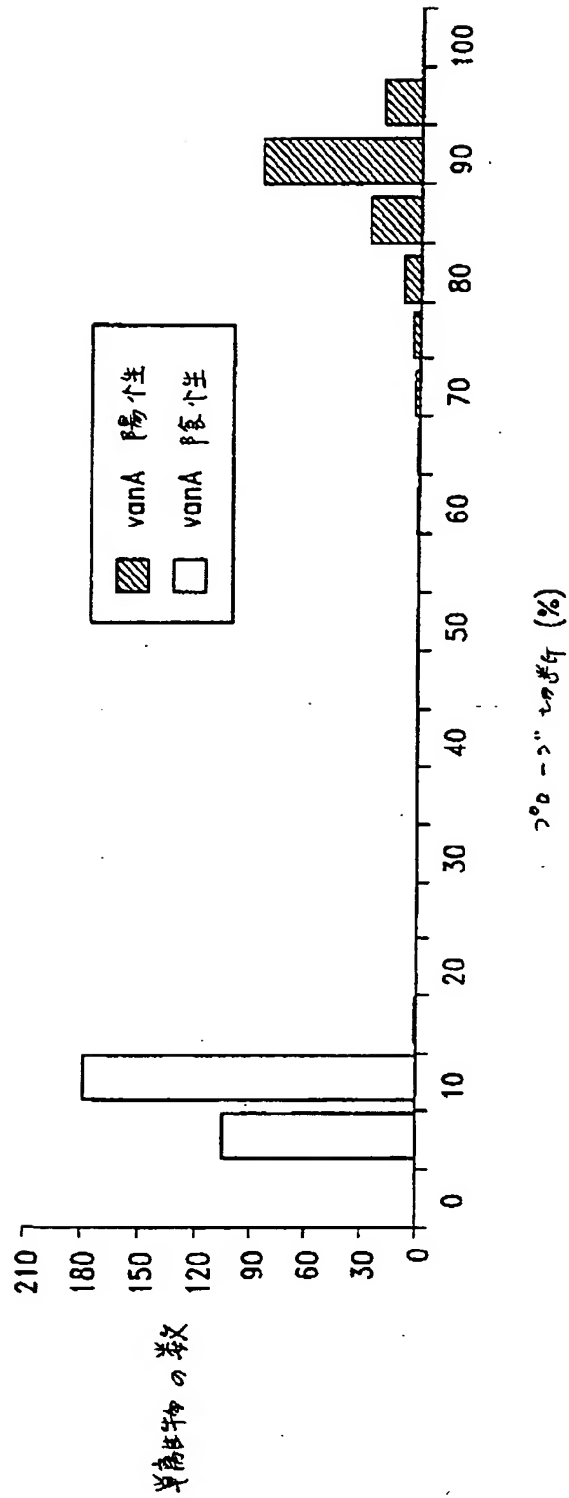


Fig. 2

【図 3】

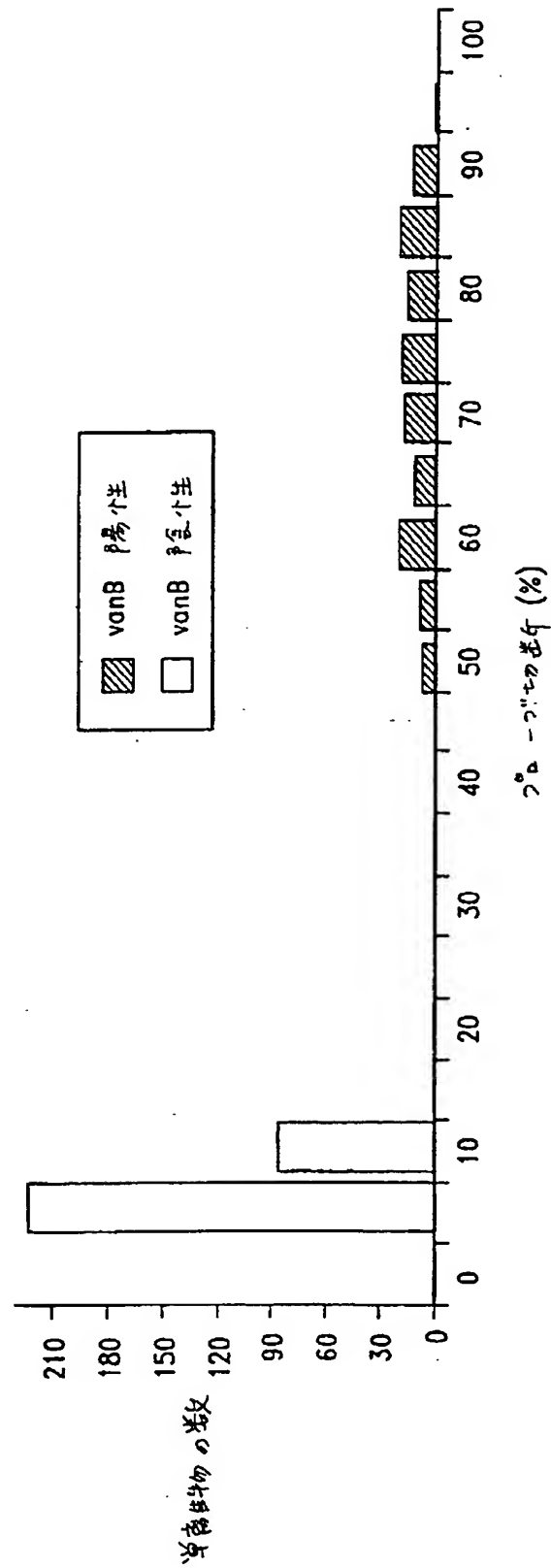


Fig. 3

【図 4】

vanA811L-27 新造 vanB857-20 キメラ構造  
を用いる 99重 CPT

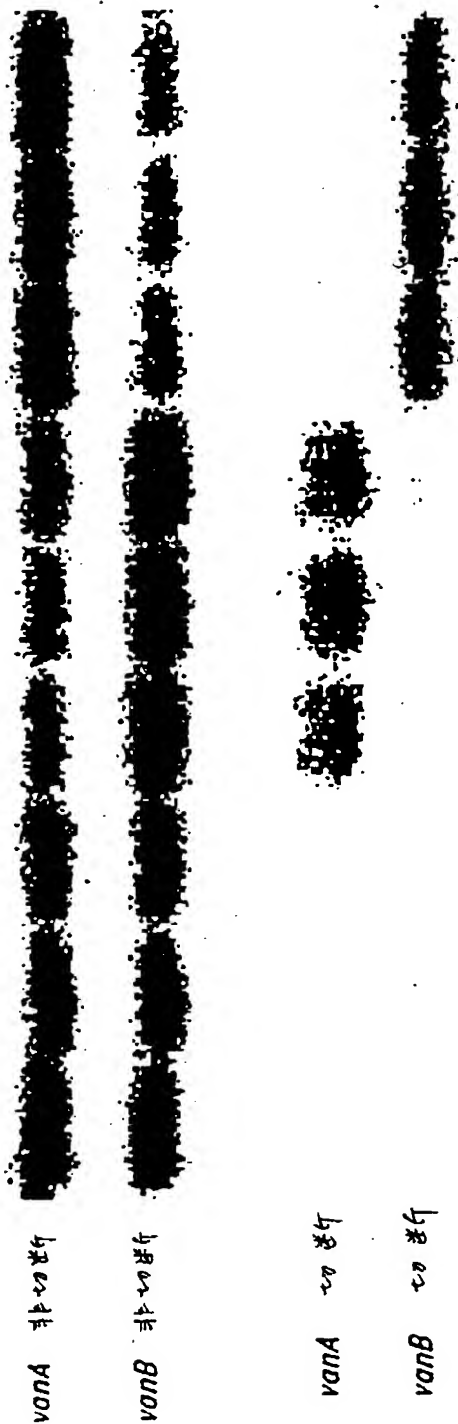
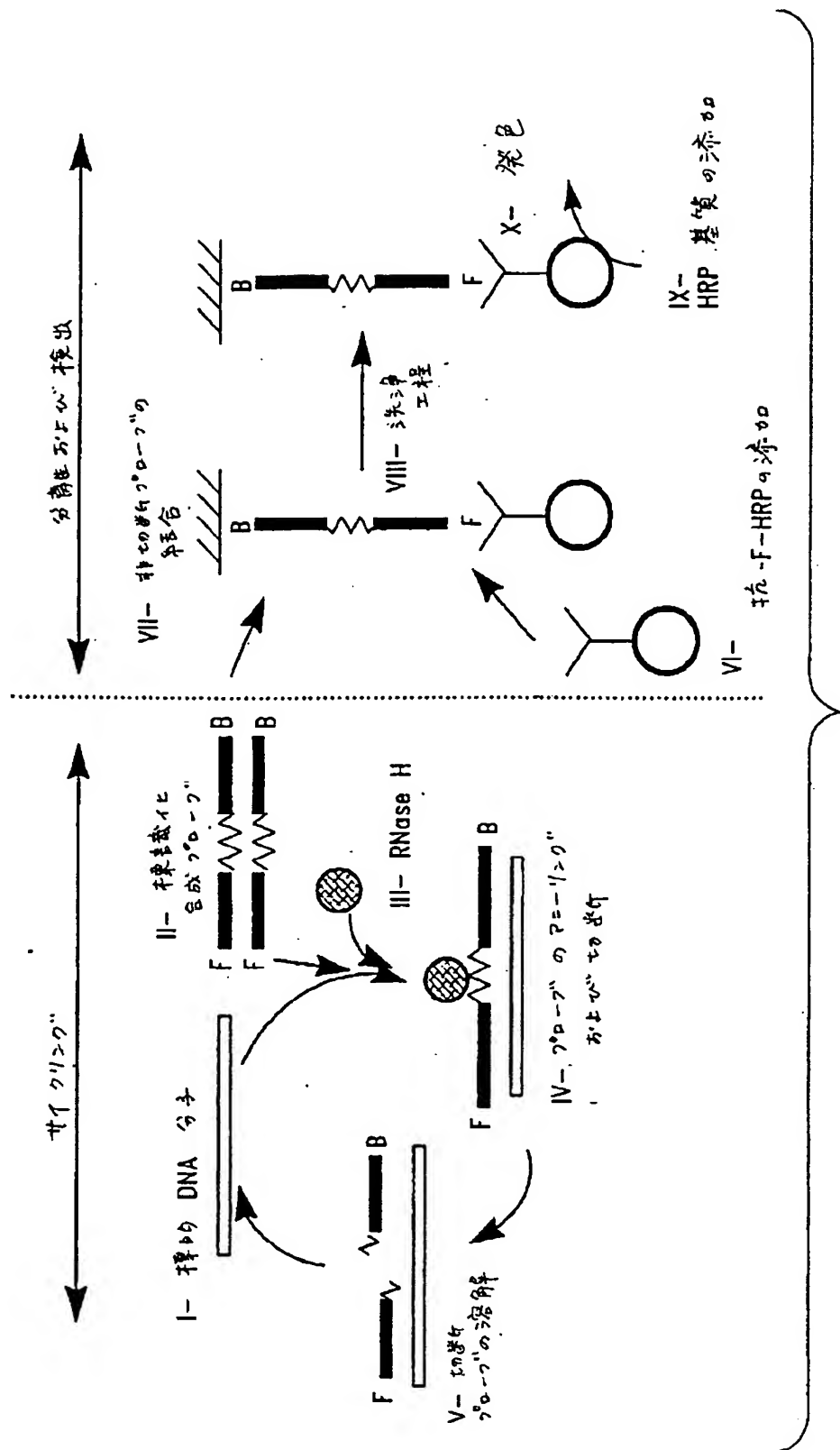


Fig. 4

【図5】



【图6】

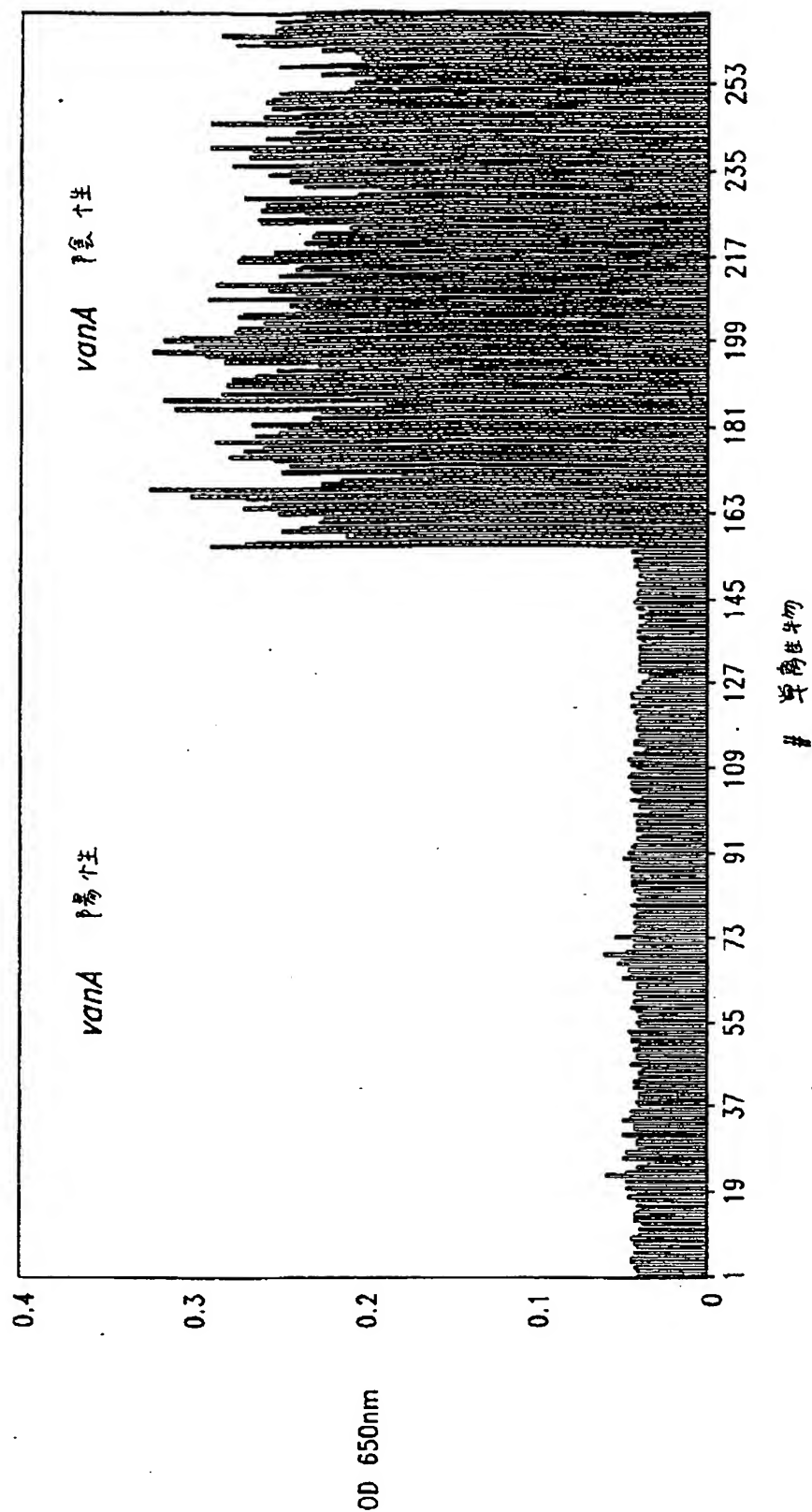


Fig. 6

【图7】

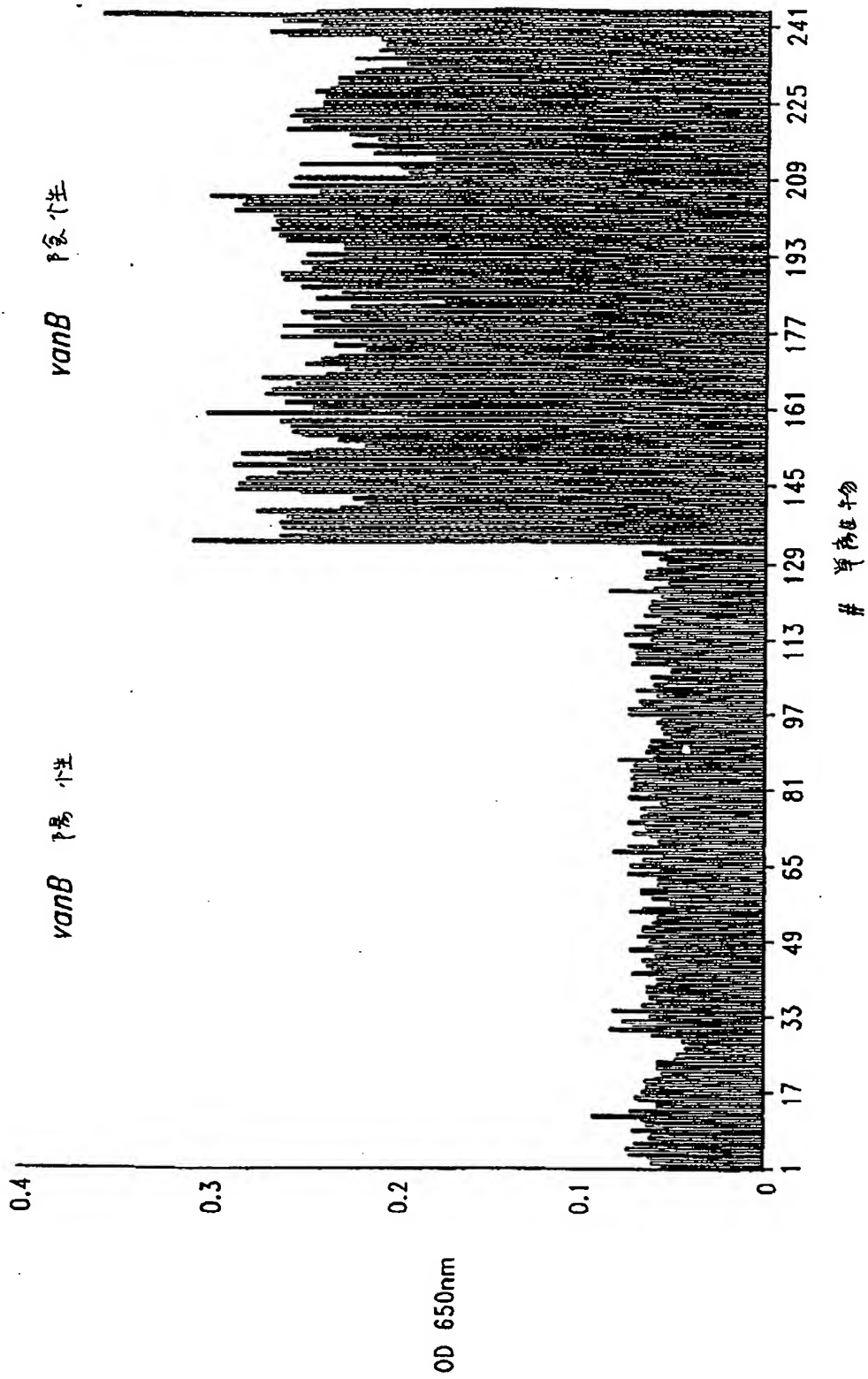


Fig. 7



## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/CA 98/00632

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 0 227 976 A (MEIOGENICS INC) 8 July 1987 see whole doc esp. claims ---	1-21
Y	WO 96 08582 A (BERGERON MICHEL G ;QUELLETTE MARC (CA); ROY PAUL H (CA)) 21 March 1996 see whole doc., esp. table 8, p.38; claims (esp.1-3) ---	1-21
A	US 5 403 711 A (WALDER JOSEPH A ET AL) 4 April 1995 see claims and col. 6 ff ---	1-21
A	WO 95 14106 A (ID BIOMEDICAL CORP) 26 May 1995 see whole doc. esp. claims and figures ---	1-21
	--- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 December 1998

Date of mailing of the international search report

07/01/1999

Name and mailing address of the ISA  
European Patent Office, P.O. 5818 Patatlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 051 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Müller, F

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/CA 98/00632

C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 95 00667 A (UNIV NEW YORK) 5 January 1995 see the whole document	1-21
A	ARTHUR M. ET AL.: "The vanZ gene of Tn1546 from Enterococcus faecium BM4147 confers resistance to teicoplanin" GENE, vol. 154, - 1995 pages 87-92, XP002088482 see the whole document	1-21
A	FR 2 699 537 A (PASTEUR INSTITUT) 24 June 1994 see the whole document	1-21
A	Beggs M. et al., Characterization of mycobacterium tuberculosis complex direct repeat sequence for use in cycling probe reaction Journal of clinical microbiology, 12-1996, Vol. 34, No. 12, 2985-2989 XP002088492	1-21
A	Patel R. et al., Multiplex PCR detection of vanA, vanB, vanC-1, and vanC-2/3 genes in enterococci; J. Clin. Microbiol., 3-1997, Vol. 35, No. 3, 703-707 XP002088493 see the whole document	1-21

Form PCT/ISA210 (continuation of second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

national Application No

PCT/CA 98/00632

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0227976	A	08-07-1987	US 4876187 A	24-10-1989
			AU 601383 B	13-09-1990
			AU 6610886 A	11-06-1987
			CA 1304703 A	07-07-1992
			FI 864964 A	06-06-1987
			JP 2742905 B	22-04-1998
			JP 8242896 A	24-09-1996
			JP 2691177 B	17-12-1997
			JP 62190086 A	20-08-1987
			US 5011769 A	30-04-1991
WO 9608582	A	21-03-1996	AU 3468195 A	29-03-1996
			BR 9508918 A	21-10-1997
			CA 2199144 A	21-03-1996
			EP 0804616 A	05-11-1997
			JP 10504973 T	19-05-1998
			NO 971111 A	09-05-1997
			NZ 292494 A	25-03-1998
US 5403711	A	04-04-1995	AU 623642 B	21-05-1992
			AU 3294489 A	16-10-1989
			DE 68911648 D	03-02-1994
			DE 68911648 T	23-06-1994
			EP 0365627 A	02-05-1990
			WO 8909284 A	05-10-1989
			AT 151467 T	15-04-1997
			AU 2782989 A	05-07-1989
			CA 1339935 A	30-06-1998
			DE 3855864 D	15-05-1997
			DE 3855864 T	25-09-1997
			EP 0348458 A	03-01-1990
			JP 2502516 T	16-08-1990
			WO 8905358 A	15-06-1989
			US 5491133 A	13-02-1996
WO 9514106	A	26-05-1995	AU 8102694 A	06-06-1995
			US 5660988 A	26-08-1997
WO 9500667	A	05-01-1995	AU 691505 B	21-05-1998
			AU 7173994 A	17-01-1995
			AU 7208394 A	17-01-1995
			AU 7208894 A	17-01-1995
			AU 8091198 A	22-10-1998
			BR 9406898 A	26-03-1996
			CA 2165163 A	05-01-1995
			CA 2165544 A	05-01-1995
			CA 2165545 A	05-01-1995
			CN 1129461 A	21-08-1996
			EP 0752007 A	08-01-1997
			EP 0708839 A	01-05-1996
			EP 0708840 A	01-05-1996
			JP 9502341 T	11-03-1997
			JP 9502084 T	04-03-1997
			WO 9500665 A	05-01-1995
			WO 9500666 A	05-01-1995
			US 5593834 A	14-01-1997
FR 2699537	A	24-06-1994	FR 2699539 A	24-06-1994

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

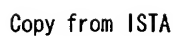
Information on patent family members

International Application No

PCT/CA 98/00632

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2699537 A		CA 2152066 A	07-07-1994
		EP 0672147 A	20-09-1995
		WO 9414961 A	07-07-1994
		JP 8505050 T	04-06-1996
		US 5770361 A	23-06-1998
<hr/>			

Form PCT/ISA210 (patent family annex) (July 1992)



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**